

RECEIVED	
18 MAR 2004	
WIPO	PCT

PCT/JP2004/000957

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

30.1.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 2月19日

出願番号
Application Number: 特願2003-040806

[ST. 10/C]: [JP2003-040806]

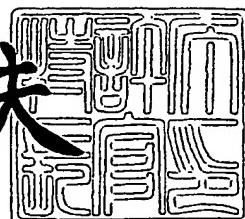
出願人
Applicant(s): 株式会社ディナベック研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 3月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 D3-A0208
【提出日】 平成15年 2月19日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61P 9/10
C12N 15/86

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区宮ヶ丘2-1-30-602
【氏名】 濱田 洋文

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南21条西15丁目1-1-409
【氏名】 伊藤 克礼

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市中央区南4条西16丁目松井ビル503
【氏名】 高橋 一泰

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市西区山の手1条2丁目6-6
【氏名】 森川 雅之

【特許出願人】

【識別番号】 595155107
【氏名又は名称】 株式会社ディナベック研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716812.

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 虚血疾患の治療方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 虚血性心疾患の治療方法であって、アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターを投与する工程を含む方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の虚血性心疾患の治療方法であって、アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターを投与する工程を含み、血管内皮増殖因子を投与しない方法。

【請求項 3】 アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターが、アンギオポエチン-1をコードするウイルスベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】 アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターがnaked DNA (裸のDNA) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】 アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターが、CAプロモーターあるいはCAプロモーターと同等またはそれ以上の転写活性を有するプロモーターによりアンギオポエチン-1の発現を駆動するベクターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】 アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターの投与が心筋への注入である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】 虚血疾患の治療方法であって、アンギオポエチン-1をコードするウイルスベクターを投与する工程を含む方法。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の虚血疾患の治療方法であって、アンギオポエチン-1をコードするウイルスベクターを投与する工程を含み、血管内皮増殖因子を投与しない方法。

【請求項 10】 ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】 ベクターの投与が虚血部位への注入である、請求項 8 に記

載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明はアンギオポエチン-1 (Angiopoietin-1; Ang1) またはAng1をコードするベクターを用いる虚血疾患の治療方法に関する。また本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを含む虚血疾患治療キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

急性の損傷または動脈閉塞による虚血は、ときに四肢脱落、機能障害、または死をもたらす重篤な疾患となる。特に急性心筋梗塞・重症狭心症などの虚血性心疾患は社会環境変化、老齢化社会の到来により急速に増加し、成人病のなかでも多くの比重を占めている。急性心筋梗塞に対する治療はPTCA（経皮冠動脈形成術）・CABG（冠動脈バイパス術）など外科的な血行再建術が主体である。これらの既存の治療法に加え血管再生を促進する遺伝子工学的手法を合わせることにより心機能の積極的な改善、病床期間の短期化が可能となり得る。

【0003】

これまで米国を中心に、その強い血管内皮増殖刺激作用から、血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) 遺伝子・蛋白質を用いた冠動脈虚血 (Losordo, D.W., et al. (1998) Circulation. 98: 2800-2804; Rosengart, T.K., et al. (1999) Circulation. 100: 468-474; Lathi, K.G., et al. (2001) Anesth Analg. 92: 19-25; Symes, J.F., et al. (1999) Ann Thorac Surg. 68: 830-836; discussion 836-837) および重症虚血肢 (Baumgartner, I., et al. (1998) Circulation. 97: 1114-1123; Isner, J.M., et al. (1998) J Vasc Surg. 28: 964-973; discussion 973-965; Baumgartner, I., et al. (2000) Ann Intern Med. 132: 880-884) に対する血管新生療法臨床試験が進行中である。しかし現在のところ、VEGF遺伝子治療の虚血性心疾患に対する適応は重症狭心症に限られ、急性心筋梗塞はその対象とはなっていない。心筋梗塞などの急性虚血では梗塞後、短時間で心筋局所・末梢血白血球・単核球、マクロファージで

のVEGF産生が亢進し、循環VEGFが極めて高い状態であることが明らかとなっている (Xu, X., et al. (2001) J Thorac Cardiovasc Surg. 121: 735-742; Li, J., et al. (1996) Am J Physiol. 270: H1803-1811; Ladoux, A. and C. Frelin. (1993) Biochem Biophys Res Commun. 195: 1005-1010; Seko Y, et al. Clin Sci 92, 453-454, 1997; Banai S, et al. Cardiovasc Res. 28, 1176-1179, 1994; Berse B, et al. Mol Biol Cell, 3, 211-220, 1992; Taichman NS, J leukoc Biol, 62, 397-400, 1997)。このVEGF産生亢進の生理的意義については不明な点も多いが、虚血部における血管保護・修復に働き虚血からの敏速な回復に寄与していると推測されている (Banai S, et al. Cardiovasc Res. 28, 1176-1179, 1994)。その一方で過剰なVEGF投与は脆弱血管および未成熟血管を増加させ (Thurston, G., et al. (1999) Science. 286: 2511-2514)、投与部位で血管腫形成を誘発する (Schwarz, E.R., et al. (2000) J Am Coll Cardiol. 35: 1323-1330)。さらに心筋梗塞での高VEGF状態が肺水腫などを増悪させ、急性心筋梗塞での死亡率を増加させる可能性があることが最近Matsunoらに (Matsuno H et al. Blood 100, 2487, 2002) より報告されている。

【0004】

【非特許文献1】

Losordo, D.W., et al. (1998) Circulation. 98: 2800-2804

【非特許文献2】

Rosengart, T.K., et al. (1999) Circulation. 100: 468-474

【非特許文献3】

Lathi, K.G., et al. (2001) Anesth Analg. 92: 19-25

【非特許文献4】

Symes, J.F., et al. (1999) Ann Thorac Surg. 68: 830-836; discussion 836-837

【非特許文献5】

Baumgartner, I., et al. (1998) Circulation. 97: 1114-1123

【非特許文献6】

Isner, J.M., et al. (1998) J Vasc Surg. 28: 964-973; discussion 973-96

5

【非特許文献 7】

Baumgartner, I., et al. (2000) Ann Intern Med. 132: 880-884

【非特許文献 8】

Xu, X., et al. (2001) J Thorac Cardiovasc Surg. 121: 735-742

【非特許文献 9】

Li, J., et al. (1996) Am J Physiol. 270: H1803-1811

【非特許文献 10】

Ladoux, A. and C. Frelin. (1993) Biochem Biophys Res Commun. 195: 1005-1010

【非特許文献 11】

Seko, Y., et al. (1997) Clin Sci 92, 453-454

【非特許文献 12】

Banai, S., et al. (1994) Cardiovasc Res. 28, 1176-1179

【非特許文献 13】

Berse, B., et al. (1992) Mol Biol Cell, 3, 211-220

【非特許文献 14】

Taichman, N.S. (1997) J Leukoc Biol, 62, 397-400

【非特許文献 15】

Thurston, G., et al. (1999) Science. 286: 2511-2514

【非特許文献 16】

Schwarz, E.R., et al. (2000) J Am Coll Cardiol. 35: 1323-1330

【非特許文献 17】

Matsuno, H., et al. (2002) Blood 100, 2487

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを用いる虚血疾患の治療方法を提供する。また本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを含む虚血疾患治療キットを提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

強力な血管誘導作用を有することが知られるVEGF165を心筋梗塞急性期にアデノウイルスベクターにより心筋局所で発現させたところ、生存ラットの梗塞心で血管誘導作用は確認されたものの、梗塞後4～5日後の急性期死亡率増加が確認された。この死亡ラットを剖検したところ著明な4～5mlの胸水貯留が認められた（データ省略）。VEGFが毛細血管透過性を亢進させることから、VEGF165投与による心筋梗塞後の肺血管透過性を検討したところ著明に増加していた（データ省略）。Matsunoらは α 1-antiplasminノックアウトマウスで心筋梗塞後高VEGF状態が誘導され肺水腫による死亡が増加することを報告している。本発明者らが行なった上記の実験においても、心筋梗塞後の高VEGF状態に加え、over-expressionしたVEGF165が肺血管の透過性を亢進し肺水腫を誘発し死亡率を増大させたことが推定される。本発明者らは、より安全で有効な心筋梗塞遺伝子治療法を開発するため、アンギオポエチン-1（Angiopoietin-1；Ang1）に着目した。

【0007】

Tie-2受容体リガンドであるAng1はVEGFと協調的に作用し血管新生・血管成熟・血管安定化に関わる重要な血管新生因子である（Davis, S., et al. (1996) Cell. 87: 1161-1169; Sato, T.N., et al. (1995) Nature. 376: 70-74）。Ang1とVEGFとを同時に投与することによって、虚血動物モデルにおいて血管再生が促進されることが報告されている（Jones, M.K., et al. (2001) Gastroenterology. 121: 1040-1047; Chae, J.K., et al. (2000) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20: 2573-2578）。また本発明者らは閉塞性動脈硬化症モデルにおいてAng1遺伝子およびVEGF遺伝子を併用した遺伝子治療がVEGFの血管透過性亢進による浮腫などの副作用を軽減しつつVEGFの血管新生作用を増強することを報告してきた（Ito., Y., et al., Molecular Therapy, 5(5), S162, 2002; WO02/100441）。今回本発明者らは、虚血心にAng1を単独で投与して、その治療効果を検証した。Ang1は単独では血管内皮増殖刺激活性はないと言われており、実際に、Ang1トランスジェニックマウスでは血管内径の増大が認めらるが血管密度は増加しない（Thurston, G., J. Anat. 200: 575-580 (2002))。しかし心筋梗塞などの急性虚血

では内因性のVEGFが極めて高い状態であることから、本発明者らは、Ang1の単独投与でも血管新生効果が得られると考えた。すなわち、Ang1を心筋梗塞急性期に使用することにより、生体内で産生が亢進するVEGFと協調的に血管新生を促進し、VEGF産生亢進に伴うtoxicityを軽減しつつ血管再生を促すストラテジーが可能となると考えた。Ang1は心筋梗塞の増悪にかかるVEGF、IL-1、およびTNFなど炎症性サイトカインにより誘導される血管透過性亢進・血液凝固亢進状態などを拮抗的に抑制する (Thurston, G. (2002) J Anat. 200: 575-580; Thurston, G., et al. (2000) Nat Med. 6: 460-463; Thurston, G., et al. (1999) Science. 286: 2511-2514)。本発明者らは、Ang1投与により、心筋梗塞急性期に産生の亢進する炎症性サイトカインによる血管透過性亢進・血液凝固亢進をも予防できると予想した。

【0008】

そこで本発明者らは、Ang1遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを作製し、ラット心筋梗塞モデルを用いてAng1発現ベクターを心筋内投与し、その血管新生効果、梗塞巣縮小効果、心機能の改善、および死亡率の低下を検討した。

【0009】

動脈結紮により誘導した心筋梗塞により、梗塞部およびその周辺領域の血管密度は著明に減少した。さらに遺伝子投与部位より離れた中隔心筋でも心筋梗塞後に血管密度の減少が認められた。この理由は不明であるが心筋梗塞後の心不全状態を反映していると推測される。このモデルラット心臓の梗塞予定領域の周辺部にアデノウイルスベクターを心筋内投与した。手術の5日後に導入遺伝子の発現を調べたところ、梗塞心においても正常心に投与した場合とほぼ同レベル（約80%）の発現を示し、梗塞周辺領域にベクターを注入することで導入遺伝子の十分な発現量が得られることが実証された。興味深いことにAng1遺伝子投与群において梗塞部とその周辺領域の血管密度が増加していたのみならず中隔領域での血管密度も明らかに増加していた。このことはAng1が投与局所での血管新生を促しているのみではなく流血中に分泌され遠隔心筋での血管新生を誘導することを示唆している。またAng1遺伝子投与群では直径 $10\mu\text{m}$ 以上の血管の増加が明らかであり、さらにより機能的な血管であることを示す周囲細胞を伴った血管も明らかに

増加していた。これはAng1により誘導された血管がより機能的であることを支持している。

【0010】

Ang1が梗塞心において血管密度を増大させることが明らかとなったが、この血管密度の増大がはたして梗塞巣の減少、心機能の改善に寄与しているか否かが臨床応用において最も重要である。心筋梗塞後4週目に梗塞巣を計測したところ、Ang1遺伝子投与群において梗塞巣の縮小と梗塞壁厚の増大が認められた。心機能的には特に左室短径短縮率 (FS, fractional shortening)、収縮期左室面積 (LV As, left ventricular area at systole)、および左室駆出率 (EF, ejection fraction) の改善を認めた。これまで肝細胞増殖因子 (HGF)、低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α)、およびVEGFがラット左前下行枝結紮による心筋梗塞モデルにおいて血管新生を誘導し、梗塞巣を縮小することが報告されている。しかしながら、血管新生因子単独で重篤な心筋梗塞での心機能を改善した報告はほとんどなく、心機能の改善は胎児心筋、ES細胞、筋芽細胞など心筋の絶対量を補う細胞療法を併用した場合にのみに効果が認められている (Yau, T.M., Circulation 104: I218-I222 (2001); Suzuki, K., Circulation 104: I207-212 (2001); Orlic, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10344-10349 (2001))。本発明においてAng1の単独投与が、梗塞心の心機能を改善できることが初めて示された。心筋梗塞急性期におけるAng1投与により、梗塞後死亡率の低下、心筋での血管数の増加、心筋梗塞巣の縮小、および心機能の改善などの顕著な効果がもたらされる。Ang1遺伝子治療は、急性心筋梗塞に対するあらたな治療法として有効である。

【0011】

また本発明者らは、Ang1を高発現するアデノウイルスベクターを用いて、重症虚血肢モデルマウスに対してAng1遺伝子の単独投与による遺伝子治療を実施した。心筋においてnaked DNAが極めて効率的な発現を示すのとは対照的に、骨格筋においてはnaked DNAベクターによる導入遺伝子の発現レベルは低く (実施例8) 、Ang1プラスミドの直接投与では虚血肢において十分な救肢効果は期待できなかった (W002/100441)。しかし骨格筋においてnaked DNAよりも発現効率の高いウイルスベクターを用いることによって、Ang1遺伝子の単独投与が、顕著な救肢効

果を発揮することが明らかとなった（実施例7）。特筆すべきことに、Ang1遺伝子投与による救肢効果は、artetiogenesisによる血液の組織還流が開始するよりも前においても観察された。従ってAng1遺伝子治療は、血管形成の誘導による治療効果だけでなく、抗アポトーシス作用などによる効果により、血管形成が誘導されるよりも早い段階から虚血組織を保護するという予想外の効果を発揮したと考えられる。このように、Ang1をコードするウイルスベクターを用いたAng1遺伝子の単独投与は、虚血心疾患のみならず、四肢虚血、血流不全を伴う損傷、および切断などの外傷および骨折などを含む虚血疾患一般においても、プラスミドベクターでは困難であった治療効果を得ることが期待できる。VEGFを併用するこれまでの治療では、過剰なVEGFが血管の透過性亢進をもたらし肺水腫などを増悪させる懸念があるが、Ang1をコードするウイルスベクターの単独投与により、このような副作用を回避しつつ効果的な虚血治療を実施することが可能である。

【0012】

すなわち本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを用いる虚血疾患の治疗方法、およびAng1またはAng1をコードするベクターを含む虚血疾患治療キットに関し、より具体的には、

- (1) 虚血性心疾患の治疗方法であって、アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターを投与する工程を含む方法、
- (2) (1)に記載の虚血性心疾患の治疗方法であって、アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターを投与する工程を含み、血管内皮増殖因子を投与しない方法、
- (3) アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターが、アンギオポエチン-1をコードするウイルスベクターである、(1)に記載の方法、
- (4) ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、(3)に記載の方法、
- (5) アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターがnaked DNA（裸のDNA）である、(1)に記載の方法、
- (6) アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターが、

CAプロモーターあるいはCAプロモーターと同等またはそれ以上の転写活性を有するプロモーターによりアンギオポエチン-1の発現を駆動するベクターである、(1)に記載の方法、

(7) アンギオポエチン-1またはアンギオポエチン-1をコードするベクターの投与が心筋への注入である、(1)に記載の方法、

(8) 虚血疾患の治療方法であって、アンギオポエチン-1をコードするウイルスベクターを投与する工程を含む方法、

(9) (8)に記載の虚血疾患の治療方法であって、アンギオポエチン-1をコードするウイルスベクターを投与する工程を含み、血管内皮増殖因子を投与しない方法、

(10) ウイルスベクターがアデノウイルスベクターである、(8)に記載の方法、

(11) ベクターの投与が虚血部位への注入である、(8)に記載の方法、を提供する。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明は、虚血性心疾患の治療方法であって、Ang1またはAng1をコードするベクターを投与する工程を含む方法に関する。Ang1は単独では血管内皮増殖刺激活性はなく、Ang1遺伝子単独投与により虚血性心疾患に対する治療効果が得られるか否かについては不明であった。しかし本発明において、心筋梗塞におけるAng1の単独投与が顕著な治療効果をもたらすことが実証された。急性心筋梗塞患者においては、梗塞後2～3日後に血清中VEGFが増加すること、心筋梗塞モデルでも心局所でのVEGF発現が心筋梗塞1～3日後より増加し、1週間以上持続することが知られている。また、本発明者らが作製したラット心筋梗塞モデルでも局所および血清VEGFの増加が確認できた（データ省略）。従って、Ang1単独投与による治療効果は、内因性のVEGFとの併用効果である可能性がある。過剰なVEGFは肺血管の透過性を亢進し肺水腫を誘発し死亡率を増大させるが、VEGFを投与せずAng1のみを単独で投与することにより、内因性のVEGFと遺伝子導入により発現するAng1が協調的に作用し、強力な血管新生作用を發揮し、同時にVEGF投与により起こ

り得る副作用を回避することができる。特に本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを投与する工程を含み、血管内皮増殖因子（VEGF）を投与しない、虚血性心疾患の治療方法を提供する。Ang1単独投与で梗塞部およびその周辺部に明らかな血管密度の増大が認められ、この血管密度の増大効果は同量のVEGF165遺伝子単独をアデノウイルスベクターにより導入した場合とほぼ同程度であった。

【0014】

本発明においてアンギオポエチン-1（Ang1）とは、Tie-2受容体に結合し、この受容体を介するシグナル伝達を活性化させ血管新生を促進するリガンドを言う。Tie-2はチロシンキナーゼ受容体であり内皮細胞系列で発現される（Ac. No. N M_000459, protein ID. Q02763, NP_000450）（Ziegler, S.F. et al., Oncogene 8 (3), 663-670 (1993); Boon, L.M. et al., Hum. Mol. Genet. 3 (9), 1583-1587 (1994); Dumont, D.J. et al., Genomics 23 (2), 512-513 (1994); Gallione CJ et al., J. Med. Genet. 32 (3), 197-199 (1995); Vakkula M et al., Cel 1 87 (7), 1181-1190 (1996); Witzenbichler, B. et al., J. Biol. Chem. 273 (29), 18514-18521 (1998); Asahara, T. et al., Circ. Res. 83 (3), 233-240 (1998); Calvert, J.T. et al., Hum. Mol. Genet. 8 (7), 1279-1289 (1999)）。Tie-2はヒト以外にも、ウシ、マウスを含む哺乳動物で単離されている（Sato, T. N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (20), 9355-9358 (1993); Iwama, A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (1), 301-309 (1993)）。野生型ヒトTie-2をコードするDNAの塩基配列およびアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1および2に例示した。配列番号：2に示したヒトTie-2および上記の哺乳動物ホモログに対するリガンドであって、血管新生を促進するものは本発明において好適に用いることができる。また本発明においてAng1は、天然の蛋白質のみならず、その変形体または部分ペプチドなどであって、天然のAng1と同様にTie-2リガンドとして機能するものが含まれる。また、Tie-2の細胞外ドメインに結合する抗Tie-2抗体の断片または非ペプチド性化合物であってTie-2リガンドとして機能するものであってもよい。

【0015】

哺乳動物Ang1蛋白質は、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシなどを含む様々な哺乳動物から単離されている (Davis, S. et al., Cell 87 (7), 1161-1169 (1996); Valenzuela, D.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (5), 1904-1909 (1999); Suri, C. et al., Cell 87 (7), 1171-1180 (1996); Valenzuela, D.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (5), 1904-1909 (1999); Kim, I., et al., Cardiovasc. Res. 49 (4), 872-881 (2001); Mandriota, S.J. and Pepper, M.S., Circ. Res. 83 (8), 852-859 (1998); Goede, V. et al., Lab. Invest. 78 (11), 1385-1394 (1998)) (GenBank Ac. No: U83508, UNM_009640, AF233227, NM_053546; protein_ID: AAB50557, NP_033770, 008538, AAK14992, NP_445998, 018920)。野生型ヒトAng1をコードするDNAの塩基配列とアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：3および4に例示した。配列番号：4に示したヒトAng1および上記の哺乳動物ホモログを好適に用いることができる。

【0016】

また、ヒトまたはその他の哺乳動物Ang1のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加したアミノ酸配列を含む蛋白質、ヒトまたはその他の哺乳動物Ang1のアミノ酸配列と70%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の同一性を有するアミノ配列を含む蛋白質、ならびにヒトまたはその他の哺乳動物Ang1遺伝子のコード領域の一部または全部を含む核酸とストリンジエントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であって、哺乳動物Tie-2受容体に結合し、この受容体を介するシグナル伝達を活性化させ血管新生を促進する蛋白質は本発明においてAng1に含まれる。これらの蛋白質には、Ang1の多型およびスプライシングバリエントなどが含まれ得る。

【0017】

アミノ酸の置換、欠失、および/または付加においては、改変されるアミノ酸数は、通常15以内、好ましくは11以内、より好ましくは9以内、より好ましくは7以内、より好ましくは5以内である。特にアミノ酸を保存的に置換した蛋白質は活性が維持されやすい。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン

酸)、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム(Altschul, S. F. et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410)を用いて決定することができる。具体的にはblastpプログラムを用いることができる。例えばNCBI(National Center for Biotechnology Information)のBLASTのウェブページにおいてLow complexityを含むフィルターは全てOFFにして、デフォルトのパラメータを用いて検索を行う(Altschul, S.F. et al. (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L. et al. (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F. et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) Genome Res. 7: 649-656)。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム(Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば哺乳動物野生型Ang1蛋白質のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。また、ハイブリダイゼーションにおいては、ヒトなどのAng1遺伝子の蛋白質コード配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジエントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば5×SSC、7%(W/V) SDS、100 μg/ml 変性サケ精子DNA、5×デンハルト液(1×デンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む)を含む溶液中、48°C、好ましくは50°C、より好ましくは52°Cでハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度、より好ましくは60°C、さらにこの好ましくは65°C、最も好ましくは68°Cで2×SSC中、好ましくは1×SSC中、より好ましくは0.5×SSC中、より好ましくは0.1×SSC中で、振盪しながら2時間洗浄する条件である。

【0018】

Ang1をコードするベクターとは、Ang1蛋白質をコードする核酸を含むベクターである。蛋白質をコードするとは、核酸が該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。核酸は一本鎖または二本鎖であってよい。また核酸はDNAであってもRNAであってもよい。ベクターとしては、例えばプラスミドベクター、その他のnaked DNA、ウイルスベクターが挙げられる。

【0019】

Naked DNAとは、DNAがウイルスエンベロープ、リポソーム、またはカチオニック脂質などの核酸を細胞に導入する試薬と結合していないDNAを言う (Wolff et al., 1990, Science 247, 1465-1468)。この場合、DNAは生理的に許容可能な溶液、例えば滅菌水、生理食塩水、または緩衝液中に溶解して使用することができる。プラスミドなどのnaked DNAの注入は最も安全で簡便な遺伝子送達法であり、これまでに承認されている臨床心血管遺伝子治療プロトコルの多くを占めるが (Lee, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000; 272: 230-235)、導入遺伝子の発現が比較的低いことと心筋細胞への導入効率が悪いことが、このアプローチの治療的な利益を損なっている (Lin, H. et al., Circulation 1990; 82: 2217-2221; Kass-eisler, A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 11498-11502)。例えば、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターは入手可能な最も強力な転写制御配列の1つであり、CMVプロモーターを含むベクターは臨床の遺伝子治療にも広く用いられている (Foecking, M.K, and Hofstetter H. G ene 1986; 45: 101-105)。しかしながら、骨格筋にプラスミドを注入した幾つかの報告により、強力なCMVプロモーターを利用したとしても、導入遺伝子の発現量または発現期間はしばしば不十分であることが指摘されていた。

【0020】

ところが驚くべきことに、本発明者らが、nakedプラスミドを心筋に直接注入により投与したところ、骨格筋に比べ心筋では約一桁の高い発現レベルが得られることが判明した。特に転写活性の強いCAプロモーターを持つプラスミドベクタ

ーを20 μ g用いた時の心臓における導入遺伝子の発現レベルは、6.0×10⁹ optical units (OPU) のアデノウイルスベクターによるものに匹敵した。従って、CAプロモーターあるいはこれと同等以上の転写活性を持つプロモーターを持つプラスミドを用いて、本発明の虚血疾患の遺伝子治療を実施することができる。CAプロモーターとは、CMV immediately early エンハンサーおよびニワトリ β アクチンプロモーターを含むキメラプロモーターである (Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193-199)。CAプロモーターまたはこれを同等以上の転写活性を有するプロモーターを用いれば、naked DNAを用いてより安全に遺伝子治療を実施することができる。

【0021】

CMV immediately early エンハンサーとしては、所望のCMV株のimmediately early 遺伝子エンハンサーを用いることができるが、例えば配列番号：5の1～367番目までの塩基配列を例示することができる。また、ニワトリ β アクチンプロモーターとしては、ニワトリ β アクチングノムDNAの転写開始部位を含むDNA断片であって、プロモーター活性を持つ断片を使用することができる。ニワトリ β アクチン遺伝子の第1イントロンには転写を促進する活性があるため、このイントロンの少なくとも一部までを含むゲノムDNA断片を用いることが好ましい。このようなニワトリ β アクチンプロモーターとしては、具体的には、例えば配列番号：5の368～1615番目までの塩基配列を例示することができる。イントロンのアクセプター配列は、適宜他の遺伝子の配列を使うことができ、例えばウサギ β グロビンのイントロンアクセプター配列を用いてよい。本発明においてCAプロモーターとしては、CMV immediately early エンハンサー配列の下流に、イントロンの一部までを含むニワトリ β アクチンプロモーターを連結し、その下流に所望のイントロンアクセプター配列を付加したDNAが好適である。一例を配列番号：5に示した。この配列の最後のATGを開始コドンとして、Ang1蛋白質のコード配列を付加すればよい。但し、CMVおよびニワトリ β アクチン遺伝子は、単離株または単離個体によって配列に多様性があり得る。また、CMV immediately early エンハンサーおよびニワトリ β アクチンプロモーターとして配列番号：5に示したのと全く同一の領域を使う必要はなく、当業者であれば様々なバリエントを構築す

ることができる。配列番号：5に示したプロモーターと同等またはそれ以上の転写活性を有するバリエントは全て、本発明において好適に用いることができる。

【0022】

ベクター中にSV40oriが含まれる場合は、SV40ori配列を欠失させることが好ましい。SV40 large T antigenは幾つかのヒト癌に関連しており、SV40に関連した癌を持つ患者ではSV40oriを含むベクターの増幅が懸念される (Martini, F. et al., Cancer 2002; 94: 1037-1048; Malkin, D. Lancet 2002; 359: 812-813)。本発明者らの検証によれば、ベクターからSV40oriを欠失させても、導入遺伝子の発現は骨格筋でも心臓でも影響されなかった(実施例8)。この結果は、CAプロモーターの制御下にAng1を発現する、SV40oriを持たないベクターが、心筋遺伝子治療への臨床適用に最も安全かつ有用なベクターの1つであることを示唆する。特にSV40oriを欠失させたpCA1ベクターは、心筋遺伝子治療に適していると考えられる。

【0023】

また、DNAは適宜トランスフェクション試薬と組み合わせて投与することもできる。例えば、リポソームまたは所望のカチオニック脂質と結合させてトランスフェクション効率を上昇させることができる。

【0024】

本発明の虚血疾患治療に用いられるもう1つの好ましいベクターはウイルスベクターである。ウイルスベクターを用いることによって、心筋のみならず骨格筋など他の組織においても十分な量のAng1を発現させることができる。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターなどが挙げられるがこれらに制限はない。好ましくはアデノウイルスベクターが用いられる。アデノウイルスベクターは適宜公知のベクターを用いることができ、それらは例えば外来遺伝子発現の向上のため、または抗原性の減弱などのために野生型ウイルスの遺伝子が改変されていてよい。アデノウイルスベクターの作製は、例えば斎藤らにより開発されたCOS-TPC法 (Miyake, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-1324 (1996)) を用い

ることができる。

【0025】

ベクターにAng1を組み込む場合は、Ang1遺伝子の発現効率を高めるため、Ang1の開始コドン周辺の配列はKozakのコンセンサス配列 [例えばCC(G/A)CCATG] とすることが好ましい (Kozak, M., Nucleic Acids Res 9(20), 5233 (1981); Kozak, M., Cell 44, 283 (1986); Kozak, M. Nucleic Acids Res. 15:8125 (1987); Kozak, M., J. Mol. Biol. 196, 947 (1987); Kozak, M., J. Cell Biol. 108, 229 (1989); Kozak, M., Nucl. Acids Res. 18, 2828 (1990))。

【0026】

本発明において虚血疾患とは、組織への血液供給の減少または途絶による機能異常あるいは組織変性または壊死を言い、具体的には心筋梗塞および狭心症などの虚血性心疾患、並びに四肢虚血、血流不全を伴う損傷、および切断などの外傷および骨折などが含まれる。すなわち本発明において虚血疾患には、虚血性の疾病のみならず、損傷・傷害による虚血状態も含まれる。Ang1またはAng1をコードするベクターを投与することにより、血管形成誘導、および抗アポトーシス作用および抗炎症作用などの他の作用により、虚血組織周辺の壊死が抑えられ、機能が改善される。本発明のAng1の投与において、好ましくはVEGFは投与しない。VEGFを投与しなくとも、Ang1の単独投与で有意な治療効果が期待できる。VEGFを投与しないとは、具体的には、Ang1またはAng1をコードするベクターの投与の前後、少なくとも12時間以内、好ましくは24時間以内、より好ましくは14日以内に、VEGFまたはVEGFをコードするベクターを投与しないことを言う。なお、微量または痕跡量のVEGFまたはVEGFをコードするベクターを投与したとしても、そのVEGFの作用が有意に検出できない程度であればそれは投与しないと考える。VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) は血管内皮細胞に特異的な増殖因子でありVPF (Vascular Permeability Factor; 血管透過性亢進因子) として1989年に報告され現在VEGF A, B, C, D, Eに分類されている (渋谷正史, VEGF受容体とシグナル伝達, 最新医学 56:1728-1734, 2001)。VEGF Aはさらに6種類のサブタイプに分けられそのうち可溶性のVEGF121, 165が特に強い血管増殖能を持つとされ現在臨床応用されている。本発明においてVEGFとしては特にVEGF165およびVEGF121

が挙げられ、好ましくはVEGF165およびVEGF121を含むVEGFの各種メンバーが含まれる。特に、内因性VEGFレベルが亢進する症状を伴う虚血疾患に対して本発明の治療方法は有効性が高い。内因性VEGFレベルが亢進するとは、血中または組織局所における内因性VEGFレベルが健常者のそれよりも高いことを言う。上記に挙げた心筋梗塞、狭心症、急性四肢虚血、血流不全を伴う損傷、切断、骨折等においては、内因性VEGFレベルが上昇する。

【0027】

本発明において虚血性心疾患とは、心筋への血液供給の減少または途絶による心機能異常あるいは心筋の変性または壞死を言い、具体的には狭心症、心筋梗塞、および一部の心筋症が含まれる。Ang1またはAng1をコードするベクターを虚血心に投与することにより、血管形成が促進され心機能が改善される。本発明の方法は、特に内因性VEGFレベルが亢進する症状を伴う虚血性心疾患に対して高い効果を発揮し、例えば狭心症、心筋梗塞、および虚血性心筋症などが治療の対象として適している (Xu, X., et al. (2001) J Thorac Cardiovasc Surg. 121: 735-742; Banai, S., et al. (1994) Cardiovasc Res. 28: 1176-1179; Sellke, F. W., et al. (1996) Am J Physiol. 271: H713-720)。本発明の方法が最も有効な虚血性心疾患は心筋梗塞である。

【0028】

狭心症とは、心筋が一過性に虚血、つまり酸素欠乏に陥ったために生ずる胸部不快感を主症状とする臨床的症候群を意味する (小川久雄, 狹心症に対する薬物療法, 別冊医学のあゆみ; 循環器疾患:352-355, 1996, 矢崎義雄他編, 医歯薬出版株式会社)。急性心筋梗塞は冠動脈の血流障害により心筋壞死を伴う虚血性心疾患である (阿武正弘, 高野照夫, 急性心筋梗塞, 循環器疾患最新の治療 2002-2003 II 冠動脈疾患: 37-42, 2002, 篠山重威、矢崎義雄編、南江堂)。

【0029】

本発明の虚血疾患の治療においては、VEGFのみならず、他の血管新生因子または血管新生因子をコードするベクターも投与しないことが好ましい。血管新生因子とは、血管構成に関与する細胞の発生、遊走、増殖、成熟に直接、あるいは間接的に関わる因子を言う。具体的には、血管内皮増殖因子 (VEGFs)、線維芽細胞

増殖因子 (FGFs)、上皮増殖因子 (EGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、胎盤由来増殖因子 (PDGF)、単球走化性蛋白質-1 (MCP-1)、thymidine phosphorylase (TP)、アンギオポエチン (Angiopoietin)、エフリン (ephrin / Eph)、マトリクスメタロプロテナーゼ (MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) などが含まれる (Kuwano, M. et al., Angiogenesis Int. Med. 40: 565-572 (2001); Freedman, S.B. et al., Ann. Intern. Med. 136:54-71 (2002))。投与しないとは、投与個体においてこれらの血管新生因子の作用を有意に検出するほどの量またはそれ以上を投与しないという意味である。

【0030】

虚血組織への投与においては、Ang1またはAng1をコードするベクターを、全身投与または虚血組織に局所投与する。Ang1は大量投与によっても顕著な副作用を示さないことから、全身投与による虚血治療が可能である。投与においては、Ang1またはAng1をコードするベクターの直接投与、あるいは担体を用いた投与が挙げられる。担体は、生理的に許容できるもので、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などがあげられる。更に担体はこれらの生理的に許容される材料の混合組成物でも良い。用いるベクターは生理的に許容されるベクターならば特に制限はなく、上に例示したウイルスベクター、あるいは非ウイルスベクターも含めて、所望のベクターが利用できる。またベクターはベクターにより処理された患者自身の細胞の形態で投与してもよい。例えばベクターまたはベクターを導入した細胞の筋肉（骨格筋）内注射や静脈内注射（*in vivo*投与および*ex vivo*投与）が考えられる。全身投与（筋注、ないし静注）された細胞は、病変局所へ移行することにより虚血組織の生存を促進し得る。心臓への局所投与のためには、注射によりAng1またはAng1をコードするベクターを心筋に注入（*injection*）すればよい。注入手段は通常の医療用注射器または、体外および体内に留置される持続注入器などの工業製品があげられる。

【0031】

投与量は、例えばアデノウイルスであれば虚血部位周辺の生存筋（骨格筋また

は心筋など）に1箇所または複数箇所（例えば2から10箇所）に投与してよい。投与量は、例えば $10^{10} \sim 10^{13}$ pfu/body、より好ましくは $10^{11} \sim 10^{13}$ pfu/bodyが望ましい。Naked DNAであれば、虚血部位周辺の生存筋に1箇所または複数箇所（例えば2から10箇所）に投与してよい。投与部位1箇所あたりの投与量は、例えば $1\text{ }\mu\text{g} \sim 10\text{ mg}$ 、より好ましくは $100\text{ }\mu\text{g} \sim 1\text{ mg}$ が望ましい。蛋白製剤であれば虚血部位周辺の生存筋に1箇所または複数箇所（例えば2から10箇所）に投与してよい。投与量は、例えば $1\text{ }\mu\text{g/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ が望ましい。より好ましくは $10\text{ }\mu\text{g/kg} \sim 1\text{ mg/kg}$ が望ましい。また、ベクターまたは蛋白質製剤は、例えば虚血組織に至る動脈内（例えば虚血心であれば心臓の冠動脈内）に複数回（1～10回）動脈投与してよい。この場合投与部位1箇所あたりの投与量は、蛋白質製剤であれば例えば $1\text{ }\mu\text{g/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ が望ましい。より好ましくは $10\text{ }\mu\text{g/kg} \sim 1\text{ mg/kg}$ が望ましい。またベクターまたは蛋白質製剤は、経静脈的に複数回（1～10回）または持続投与してよい。この場合総投与量は、蛋白製剤であれば例えば $1\text{ }\mu\text{g/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ が望ましい。より好ましくは $10\text{ }\mu\text{g/kg} \sim 1\text{ mg/kg}$ が望ましい。ベクターであれば、上記の筋注と同様の量を投与することができる。投与量については、文献 Freedman SB et al Ann Intern Med 136:54-71 (2002) を参照することができる。

【0032】

但し、ベクターの投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状、投与組成物の形態、投与方法等により異なってよく、当業者であれば適宜調整することが可能である。投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、投与部位についても一箇所または複数箇所投与してよい。ヒト以外の動物についても、kg当たりヒトと同様の投与量とするか、あるいは例えば目的の動物とヒトとの虚血器官（心臓など）の容積比（例えば平均値）等で上記の投与量を換算した量を投与することができる。本発明の治療の対象動物としては、ヒトおよびその他の所望の哺乳動物が挙げられ、具体的にはヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなどが含まれる。

【0033】

本発明の治疗方法は、単独ないし、他のスタンダードないし先進的な治療法と

の組み合わせで実施することができる。例えば、本発明の虚血性心疾患の治療方法をPTCA（経皮冠動脈形成術）および/またはCABG（冠動脈バイパス術）などの外科的な血行再建術と組み合わせることも好適である。本発明の治療法を合わせて用いることにより、心機能の積極的な改善、病床期間の短期化が可能となる。また、本発明のAng1を用いた治療は、梗塞心筋の再生などの梗塞巣に対するリモデリングの促進などの治療を組み合わせることにより、より高い効果が期待される。Ang1による遺伝子治療は梗塞巣厚の増加をもたらすが、細胞療法の併用など心筋絶対量の不足を改善した際に認められるLVAd, Eddなど拡張期パラメーターの改善については比較的効果が弱い。Ang1による収縮期容積、駆出率などの改善は、梗塞周囲筋など残存心筋の血管密度が増加することにより梗塞周囲筋での機能低下を予防し、さらに残存心筋の代償性肥大を促進し、心筋機能を改善しているものと推測される。そこで、例えば、胎児心筋、ES細胞、または筋芽細胞などの移植または、梗塞部位への移動を誘導することにより心筋の絶対量を補う細胞療法を併用することは好ましいと考えられる。

【0034】

また本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを含む虚血性心疾患治療剤を提供する。また本発明は、虚血性心疾患の治療における、虚血心へ投与するためのAng1またはAng1をコードするベクターの使用を提供する。さらに本発明は、該Ang1またはAng1をコードするベクターを虚血心へ投与するための虚血性心疾患の治療薬製造における、Ang1またはAng1をコードするベクターの使用を提供する。特に本発明は、Ang1またはAng1をコードするベクターを含む虚血性心疾患治療剤であって、VEGFまたはVEGFベクターを投与せずに該Ang1またはAng1をコードするベクターを虚血心へ投与するための治療剤を提供する。また本発明は、虚血性心疾患の治療におけるAng1またはAng1をコードするベクターの使用であって、VEGFまたはVEGFベクターを投与せずに該Ang1またはAng1をコードするベクターを虚血心へ投与するための使用を提供する。さらに本発明は、VEGFまたはVEGFベクターを投与せずに該Ang1またはAng1をコードするベクターを虚血心へ投与するための虚血性心疾患の治療薬製造における、Ang1またはAng1をコードするベクターの使用を提供する。上記の治療剤および使用においては、VEGFのみならず、他の

血管新生因子またはその血管新生因子をコードするベクターも投与しないものであることがより好ましい。またAng1またはAng1をコードするベクターは、虚血心への局所投与のために製剤化されることが好ましい。例えば、心筋への注入により投与されるものが好ましい。Ang1をコードするベクターは、好ましくはAng1をコードするウイルスベクターまたはnaked DNAである。ウイルスベクターとしては特に制限はないが、特にアデノウイルスベクターが好ましい。naked DNAとしてはプラスミドが挙げられる。プラスミドは環状でも直鎖化されていてもよい。またプラスミドにはSV40oriが含まれないことが好ましい。ベクターにおいてAng1転写を駆動するプロモーターは強力な転写活性を持つものが好ましく、例えばCAプロモーターを好適に用いることができる。

【0035】

また本発明は、(a) Ang1またはAng1をコードするベクター、および(b) Ang1またはAng1をコードするベクターの投与において、VEGFまたはVEGFベクターを投与しないことの指示の記載または該記載へのリンクを含む記録媒体、を含む虚血性心疾患治療キットに関する。本キットは、心筋梗塞または狭心症を含む虚血性心疾患の少なくとも1つに対する治療キットである。好ましくは、本発明のキットは、狭心症および/または急性心筋梗塞に対する治療キットである。このキットには、上記で説明したAng1またはAng1をコードするベクターが含まれる。Ang1をコードするベクターは、好ましくはAng1をコードするnaked DNAまたはウイルスベクターであり、ウイルスベクターとしては特に制限はないが、特にアデノウイルスベクターが好ましい。キット中に含まれるAng1またはAng1をコードするベクターは、Ang1以外に、薬学的に許容できる所望の担体および/または添加物等を含む組成物であってよい。例えば、滅菌水、生理食塩水、慣用の緩衝剤(リン酸、クエン酸、他の有機酸等)、安定剤、塩、酸化防止剤(アスコルビン酸等)、界面活性剤、懸濁剤、等張化剤、または保存剤などを含んでよい。局所投与のために、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレングリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などと組み合わせることも好ましい。好ましい態様においては、Ang1またはAng1をコードするベクターを投与する。

ドするベクターは注射に適当な剤型に調製される。このためには、Ang1またはAng1をコードするベクターは薬学的に許容される水溶液中に溶解されているか、または溶解できるように例えば凍結乾燥製剤であることが好ましい。本発明のキットには、Ang1またはAng1をコードするベクターを溶解または希釈するために用いることができる、薬学的に許容できる所望の担体をさらに含んでもよい。このような担体としては、例えば蒸留水、生理食塩水などが挙げられる。

【0036】

また本発明は、Ang1をコードするウイルスベクターを含む虚血疾患治療剤を提供する。また本発明は、虚血疾患の治療における、Ang1をコードするウイルスベクターの使用を提供する。さらに本発明は、Ang1をコードするウイルスベクターを含む虚血疾患の治療薬製造における、該Ang1ウイルスベクターの使用を提供する。特に本発明は、Ang1をコードするウイルスベクターを含む虚血疾患治療剤であって、VEGFまたはVEGFベクターを投与せずに該Ang1ウイルスベクターを虚血個体へ投与するための治療剤を提供する。また本発明は、虚血疾患の治療におけるAng1をコードするウイルスベクターの使用であって、VEGFまたはVEGFベクターを投与せずに該Ang1ウイルスベクターを虚血個体へ投与するための使用を提供する。さらに本発明は、VEGFまたはVEGFベクターを投与せずにAng1をコードするウイルスベクターを虚血個体へ投与するための虚血疾患の治療薬製造における、該Ang1ウイルスベクターの使用を提供する。上記の治療剤および使用においては、VEGFのみならず、他の血管新生因子またはその血管新生因子をコードするベクターも投与しないものであることがより好ましい。またAng1をコードするウイルスベクターは、虚血組織への局所投与のために製剤化されることが好ましい。ウイルスベクターとしては、好ましくはアデノウイルスベクターが用いられる。

【0037】

また本発明は、(a) Ang1をコードするウイルスベクター、および(b) Ang1をコードするウイルスベクターの投与において、VEGFまたはVEGFベクターを投与しないことの指示の記載または該記載へのリンクを含む記録媒体、を含む虚血疾患治療キットに関する。本キットは、心筋梗塞および狭心症などの虚血性心疾患、並びに四肢虚血、血流不全を伴う損傷、および切断などの外傷および骨折など

を含む虚血疾患の少なくとも1つに対する治療キットである。このキットには、上記で説明したAng1をコードするウイルスベクターが含まれる。ウイルスベクターとしては特に制限はないが、特にアデノウイルスベクターが好ましい。キット中に含まれるAng1をコードするウイルスベクターは、ベクター以外に、薬学的に許容できる所望の担体および/または添加物等を含む組成物であってよい。例えば、滅菌水、生理食塩水、慣用の緩衝剤（リン酸、クエン酸、他の有機酸等）、安定剤、塩、酸化防止剤（アスコルビン酸等）、界面活性剤、懸濁剤、等張化剤、または保存剤などを含んでよい。局所投与のために、バイオポリマーなどの有機物、ハイドロキシアパタイトなどの無機物、具体的にはコラーゲンマトリックス、ポリ乳酸ポリマーまたはコポリマー、ポリエチレンギリコールポリマーまたはコポリマーおよびその化学的誘導体などと組み合わせることも好ましい。好ましい態様においては、Ang1をコードするウイルスベクターは注射に適当な剤型に調製される。このためには、Ang1をコードするウイルスベクターは薬学的に許容される水溶液中に溶解されているか、または溶解できるように例えば凍結乾燥製剤であることが好ましい。本発明のキットには、Ang1をコードするウイルスベクターを溶解または希釈するために用いることができる、薬学的に許容できる所望の担体をさらに含んでもよい。このような担体としては、例えば蒸留水、生理食塩水などが挙げられる。

【0038】

本発明のキットには、Ang1またはAng1をコードするベクターの投与において、VEGFまたはVEGFベクターを投与しないことの指示の記載または該記載へのリンクを含む記録媒体が含まれている。VEGFまたはVEGFベクターを投与しないことの指示とは、例えばVEGFまたはVEGFベクターの投与を禁忌または避けるように指示または推奨する内容の記載である。具体的には、Ang1またはAng1をコードするベクターの投与の前後、少なくとも12時間以内に、VEGFまたはVEGFをコードするベクターを投与しないことを指示する内容が記載されている。好ましくは、Ang1またはAng1ベクターの投与の前後の24時間以内、より好ましくは14日以内に、VEGFまたはVEGFベクターを投与しないことが指示されている。VEGFとしては特にVEGF165およびVEGF121が挙げられ、好ましくはVEGF165およびVEGF121を含むVEGFの各種

メンバーが含まれる。本キットには、Ang1またはAng1をコードするベクターの治療的有効量を罹患個体に投与することの記載または該記載へのリンクを含むことが好ましい。記録媒体としては、紙およびプラスチックなどの印刷媒体、フレキシブルディスク (FD)、コンパクトディスク (CD)、デジタルビデオディスク (DVD)、半導体メモリ等のコンピュータ読み取り可能な記録媒体など所望の記録媒体が挙げられる。典型的には、キットに添付される指示書などが挙げられる。リンクとは、Ang1またはAng1をコードするベクターの投与において、VEGF121を投与しないことの指示に関する記載が、キット中に直接には記載されていないが、キットに含まれる印などによって該記載と関連付けられていることを言い、その印を通して該記載にたどり着ける場合である。例えば指示書には別紙またはURLなどを参照するように指示または示唆する記載があり、別紙またはURLに該記載がある場合などが含まれる。

【0039】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

【0040】

[実施例1] VEGFおよびAng1発現アデノウイルスベクター

ヒトVEGF遺伝子はヒトグリオーマ細胞株U251由来のcDNAからPCR法にてクローニングし得られたVEGF遺伝子の塩基配列はBig-dye terminator法 (Perkin-Elmer社) によりシークエンスを確認した。同様にヒトAng1遺伝子はヒト骨髄細胞cDNAよりPCR法によりクローニングし、塩基配列を確認した。得られたAng1遺伝子の塩基配列をジーンバンクU83508と比較したところ933番目の塩基がAからGへ置換されていたことを除き同一であった。本塩基置換によるAng1蛋白質のアミノ酸配列はジーンバンクU83508と同一であった。これらのクローニングされたVEGF/Ang1 cDNAをpCAGGS (Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193-199) 由来のpCAccベクター (W002/100441; Ito., Y., et al. (2002) Mol Ther. 5: S162) のEcoRI-BglII制限酵素サイト間に挿入し、VEGF/Ang1発現ベクターであるpCAhVEGFおよび

pCAhAng1を作製した。VEGF/Ang1発現アデノウイルスは斎藤らにより開発されたCOS-TPC法 (Miyake, S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1320-1324 (1996)) を用い作製した。pCAhVEGFおよびpCAhAng1をClaI制限酵素により切斷し得られる VEGF/Ang1 cDNA、CAプロモーターを含む遺伝子発現ユニットをアデノウイルス5型遺伝子の一部を含むコスミドpAxew (Nakamura, T. et al. (2002) Hum Gene Ther. 13: 613-626) のClaI制限酵素部位に挿入し pAxCAhVEGF/Ang1を作製した。pAxCAhVEGF/Ang1と5型アデノウイルス全長を含むDNA-terminal protein complex (TPC) のEcoT22I制限酵素切斷産物をリン酸カルシウム共沈法により293細胞に遺伝子導入し、改変アデノウイルスを含むプラークを回収した (Graham, F. L. and A. J. van der Eb. (1973) Virology. 52: 456-467)。個々のプラークのアデノウイルスを制限酵素切斷パターンで確認しさらにPCRを用い野生ウイルスの混入がないことを確認し、VEGFおよびAng1発現アデノウイルスベクターであるAxCAhVEGF、AxCAhAng1を得た。ラット心筋梗塞モデルにはCsCl不連続密度勾配を用いた超遠心法により精製した後、10% glycerol添加PBSにて透析をした精製アデノウイルスを用いた (Kanegae, Y., et al. (1995) Nucleic Acids Res. 23: 3816-3821)。精製アデノウイルスベクターの濃度 (opu/ml, optical density unit s/ml) は0.1%SDS存在下でのA₂₆₀により測定し以下の式を用い決定した (Nyberg-Hoffman, C. et al. (1997) Nat Med. 3: 808-811)。

$$\text{opu} = A_{260} \times (1.1 \times 10^{12})$$

【0041】

ウイルス力価 (pfu: plaque forming units) は293細胞を用いた限界希釈法により決定した (Miyake, S., et al. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 1320-1324)。コントロールアデノウイルスとしてE. coli β -galactosidase遺伝子を発現するAxCAZ3 (Nakamura, T. et al. (2002) Hum Gene Ther. 13: 613-626) を用いた。このベクターは、挿入したcDNA以外はAxCAhAng1と同一である。今回用いたウイルスベクターのAxCAhAng1、AxCAhVEGFおよびAxCAZ3のopu/pfu比はそれぞれ13.3, 28.0, 80.0であった。

【0042】

【実施例2】 アデノウイルスベクターによる梗塞心での遺伝子発現

これまで梗塞心では、正常心と比べ外来遺伝子発現が極めて低いことが報告（Leor, J. et al. (1996) J Mol Cell Cardiol. 28: 2057-2067）されていたことから、治療実験を行う前にラット心筋梗塞モデルにおいてアデノウイルスで遺伝子導入した際に十分な遺伝子発現がされるか否かを検討した。

【0043】

ラット心筋梗塞モデルの作製

ラット心筋梗塞モデルはPfefferらの方法 (Pfeffer, M.A. et al. Cir. Res. 44: 503-512, 1979) にしたがい作製した。Lewisラット（8週令、雄、体重約300g）をジエチルエーテル吸入およびケタミン70 mg/kg, キシラジン 6~7 mg/kgを腹腔内投与にて麻酔後、挿管した。その後、分時換気量 200~250ml、1回換気量 3 ml、呼吸回数 60~80回/min、O₂ 1 l/min、ハロセン 0.5~2.0%の条件で吸入麻酔を行い、左側胸部より開胸した。左前下行枝 (LAD) を確認し6-0の非吸収糸（ナイロン糸）を用い、左前下行枝を左心耳の高さで結紮した。結紮後、呼気終末陽圧式人工呼吸 (positive end-expiratory pressure) で肺を拡張させた。肺を傷つけないように肋間を閉じた後、筋層、皮膚と連続縫合にて閉創した。対照の偽手術では、冠動脈を結紮しない以外は同様に手術を行なった。アデノウイルスベクターの心筋内投与は、左前下行枝の結紮後、左前下行枝還流域と推定される領域周辺部左右二ヶ所に30G針を用い 5×10^9 opu/50 μl（総量 1×10^{10} opuの場合）ずつアデノウイルスベクターを心筋内投与した。

【0044】

心筋内LacZ遺伝子発現の検討

アデノウイルスベクター投与によるラット心筋でのE. coli β-galacosidase遺伝子発現をX-gal染色 (Nakamura, Y., et al. (1994) Cancer Res. 54: 5757-5760) により確認した。AxCAZ3 1×10^{10} OPU/100 μlを心筋内投与5日後、深麻酔下に2% paraformaldehydeを全身に還流し臓器を固定した。摘出した固定後の心臓をX-gal (Sigma Chemical Co. St.Louis, MO) 溶液 (PBS pH 7.2, 2 mM MgCl₂, 4 mM potassium ferricyanide, 1 mg / ml Xgal) に30°Cで16時間浸し染色した。また心臓でのβ-galacosidase遺伝子発現をGalacto-Light puls kit (Tropix Inc. Bedford, MA) と β-galacosidase標準標本 (Roche) を用い、β-galacos

idase酵素活性を定量的にて検討した (Shaper NL et al. J.Biol.Chem. 269(40), 25165-25171, 1994)。AxCAZ3 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ opuを心筋内投与 5 日後にラットを屠殺、摘出心をLysis Buffer (100 mM potassium phosphate, pH 7.8, 0.2% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μg / ml leupeptin) 存在下でhomogenizeした。12,500 xg, 10 min遠心後、上清中の内因性 β -galacosidase活性を失活するため48°C、1時間インキュベートした (Young DC, Anal. Biochem. 215, 24-30, 1993)。

上清中の酵素活性はGalacto-Light pulsを用い室温で1時間反応後、化学発光をMini-Lumat LB9506 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Wildbad, Germany) を用い測定した。得られた結果 (Relative light units) は組み換え β -galacosidase標準標本 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた標準曲線により、 β -galacosidase活性(pg/ml)に変換した。

【0045】

アデノウイルスベクターの心筋内投与は以下のごとく施行した。左前下行枝の結紮後、左前下行枝還流域と推定される領域周辺部左右二ヶ所に30G針を用い 5×10^9 opu/50 μl (総量 1×10^{10} opuの場合) ずつアデノウイルスベクターを心筋内投与した。正常心および梗塞心の2ヶ所に分け心筋内投与し、5日後にその発現を測定した。図1に示すごとく 5×10^9 opu以上のアデノウイルスベクター投与により正常心、梗塞心で明らかな遺伝子発現を認め、梗塞心でも正常心とほぼ同等の発現であった。導入遺伝子の発現は用量依存的であり、アデノウイルスの用量の増加に従って発現も増加した。また梗塞心での遺伝子発現の分布は図2(A)に示すように遺伝子導入部である前側壁を中心に広範囲に認められたが、横断面でのX-gal染色像 (図2(B)) で明らかなように梗塞部心筋および中隔部、右室心筋での遺伝子発現は認めなかった。

【0046】

[実施例3] VEGFおよびAng1遺伝子導入による心筋梗塞後生存率

アデノウイルス 1×10^{10} opuにより梗塞心筋で明らかな遺伝子発現を認めたことから血管新生因子遺伝子によるラット心筋梗塞モデルの治療を行った。また慢性心筋虚血に対しすでに効果が示されているVEGF遺伝子による心筋梗塞治療効果を

同時に検討した。心筋梗塞後未治療群、コントロールアデノウイルス投与群、AxCAhVEGF投与群、AxCAhAng1投与群の心筋梗塞4週後のラット生存率を算出した。モデル作製24時間以内の死亡ラットは本算出より除外した。

【0047】

また、ベクターを投与した心臓におけるAng1の発現をRT-PCRにより調べた（図3）。アデノウイルスベクターによる遺伝子導入（ 1×10^{10} opu/心）の5日後に心臓を摘出し、全RNAをRNeasy kit (Qiagen K.K, Tokyo, Japan) により左心室心筋から抽出した。心筋全RNA中のDNAのコンタミネーションを避けるため、RNase-free DNase Set (Qiagen) を用いて説明書に従ってDNaseI消化を行った。第一鎖cDNA合成はランダムプライマーミクスチャ（Invitrogen, Carlsbad, CA）およびSeperscript™ II (Invitrogen) を用いて全RNAのランダムプライマー法により行なった。アデノウイルスベクターから転写されたヒトAng1特異的mRNAは、ヒトAng1特異的フォワードプライマーと、Ang1発現単位のターミネーター部位にあるウサギ β グロブリンに対するリバースプライマーを用いて検出した。また内部対照としてラットglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をRT-PCRにより検出した。ヒトAng1フォワードプライマー、ウサギ β グロブリンリバースプライマー、およびGAPDHプライマーを以下に示した。

ヒトAng1プライマー

フォワード， 5'-CAGAGGCAGTACATGCTAAGAATTGAGTTA-3' (配列番号：6)

ウサギ β グロブプライマー

リバース， 5'-AGATGCTCAAGGGGCTTCATGATG-3' (配列番号：7)

ウサギGAPDHプライマー

フォワード， 5'-TATTGGCGCCTGGTCACCA-3' (配列番号：8)

リバース， 5'-CCACCTTCTTGATGTCATCA-3' (配列番号：9)

30サイクルのPCRを行い、ヒトAng1 mRNAおよびGAPDH mRNAを検出した。PCR産物は2%アガロースゲルで分離した。ヒトAng1 mRNAの陽性対照として、100 opu/cellでAxCAhAng1を感染させたHeLa細胞から抽出した全RNAを用いた。

ラットGAPDH遺伝子由来の産物（内部対照）は全ての心筋RNA試料で 407 bpの位置に等しく検出された（図3）。ヒトAng1に特異的な453bpのPCRバンドを、AxCAhAng1を投与したラット心筋RNA試料で検出した。

AhAng1投与したラット心サンプル、AxCAhAng1を用い遺伝子導入したHeLa細胞サンプルに認めた。また正常心、AxCAZ3投与心ではヒトAng1に特異的なバンドは認められなかった。

【0048】

心筋梗塞モデルにおけるモデル作製24時間以内の死亡を抜いた死亡率は約25%であり、コントロールアデノウイルスAxCAZ3を投与した群では死亡率20%とアデノウイルス投与による死亡率への影響は軽微であった。まず慢性心筋虚血に対し既に効果が示されているVEGF遺伝子による心筋梗塞治療効果を検討したところ、VEGF遺伝子投与群では心筋梗塞4週後死亡率が約40%とむしろ増加することが明らかとなった。一方、 1×10^{10} opuのAxCAhAng1を投与群では8%と死亡率の低下が認められた（表1）。

このことから急性心筋梗塞ではVEGFよりAng1がより有効であることが明らかとなった。

【0049】

【表1】 実験的に心筋梗塞を誘導しラットの生存率

		%生存率
偽手術		75.9 (18/25)
AxCAZ3	1×10^{10} opu	81.3 (13/16)
AxCAhVEGF	1×10^{10} opu	60.0 (6/10)
AxCAhAng1	1×10^{10} opu	92.0 (23/25)

【0050】

[実施例4] Ang1遺伝子、VEGF遺伝子による心筋梗塞後血管誘導

VEGF遺伝子は強力な新生血管誘導作用があることが知られている。またAng1はVEGFとの協同作用にて新生血管誘導を増強することが知られている。そこでAng1遺伝子導入効果を直接証明するために、遺伝子投与した梗塞心での血管密度を測定した。心筋梗塞作製4週後の心筋内血管密度を、CD34モノクロナール抗体を用いた血管内皮細胞の免疫組織染色により評価した。心臓をホルマリンで固定後パラフィン包埋し、 $10\mu\text{m}$ の切片を作製した。1次抗体としてAnti-CD34モノクロナル抗体（MoAb）（NU-4A1, Nichirei, Tokyo Japan）を使用し、ビオチン化anti-M

ouse IgG 2次抗体とアビジン化 Horseradish peroxidase (DAB paraffin IHC staining module, Ventana Medical System Inc, Tucson, AZ) を用い染色した。サブタイプが同一のマウスIgGを用いて一次抗体の特異性を確認した。心室中隔、梗塞部周辺領域、心筋梗塞巣内残存心筋での切片内の血管数を200倍拡大し顕微鏡下でブラインドにて測定した。心臓当たり40の切片のそれぞれに対して、ランダムに選んだ5つの視野について計数した。染色された血管を、梗塞領域、境界領域、および中隔壁について計数した。結果は血管数/mm² の平均値として表記した。また、成熟血管を確認するため、抗 α -SMA MoAb (clone 1A4, Dako Japan, Tokyo, Japan) を用いて、抗CD34 MoAbと同様に染色を行なった。 α -SMA陽性の血管は、上記の毛細管密度の計数と同様に行なった。

【0051】

梗塞心では正常心に比べ梗塞部、梗塞周囲部心筋で血管密度の低下が認められた(図4)。VEGFあるいはAng1をアデノウイルスにより投与したところ、その梗塞部、梗塞周囲心筋で有意な血管密度の増加が認められ、特に遺伝子投与部近傍である梗塞周囲部では正常心筋よりさらに増加していた(梗塞周囲心筋の血管密度は、Ang1処理群では $644 \pm 96/\text{mm}^2$ 、生理食塩水処理群では $350 \pm 79/\text{mm}^2$ ($p < 0.01$ vs Ang1処理群)、AxCAZ3処理群では $332 \pm 127/\text{mm}^2$ ($p < 0.01$ vs Ang1処理群)、偽手術群では $402 \pm 121/\text{mm}^2$)。Ang1処理群では、血管腫は肉眼でも顕微鏡でも観察されなかった。興味深いことに、生食投与群およびAxCAZ3投与群では、遺伝子投与部位から離れた心室中隔部でも心筋梗塞後4週目で血管数の減少を認め(それぞれ $341 \pm 60/\text{mm}^2$ および $367 \pm 113/\text{mm}^2$)、Ang1遺伝子($461 \pm 100/\text{mm}^2$)またはVEGF遺伝子の投与によりこの中隔部での血管数の減少は抑制された(偽手術群では $483 \pm 46/\text{mm}^2$)。図5にanti-CD34 MoAbによる血管内皮の免疫染色像を示すがAng1遺伝子投与群では $10\ \mu\text{m}$ 以下のmicro vesselの増加とともに $10\ \mu\text{m}$ 以上のvesselの増加も観察された(Ang1処置した梗塞心の左心室領域では、全ての試料で多数の α -SMA陽性血管が観察された；中隔領域で $38.9 \pm 7.35/\text{mm}^2$ 、梗塞境界域で $38.9 \pm 4.81/\text{mm}^2$ 、梗塞域で $112 \pm 26.1/\text{mm}^2$)。Ang1処理群を除くいずれの群でも、 $10\ \mu\text{m}$ を超える α -SMA陽性の血管密度は有意に変化しなかった($19-22/\text{mm}^2$)。またAng1単独の遺伝子投与でもVEGF遺伝子投与と同程度の血管密度の増加が観

察された（図4）。

【0052】

[実施例5] AngI遺伝子による心筋梗塞巣の縮小

心筋梗塞モデルでのAngI遺伝子による梗塞巣への影響を確認した。以下のように、心筋梗塞域の測定を行なった。心筋梗塞4週後の梗塞域のサイズをEdelbergら (Edelberg JM et al. Circulation 105, 608-613, 2001) の方法およびRobertsらの方法 (Roberts CS et al, Am.J.Cardiol. 51, 872-876, 1983) に従い測定した。モデル作製後、4週後にラットを屠殺し梗塞心を摘出、冷生理食塩水に浸して心室から余分な血液を除去した後、4% formaldehydeで48時間固定、paraffin包埋し、 $10\text{ }\mu\text{m}$ の切片を作製した。左前下行枝結紮部と心尖部の中間部位にて短軸方向に切片を作製、Hematoxyline-Eosin染色、Masson's trichrome染色にて梗塞部を染色した。切片をデジタルカメラにて取り込みNIH imageにて以下のパラメーターをプラインドにて測定した。

【0053】

総左心室(LV)域 (Total left ventricle (LV) area) (mm^2)、梗塞域 (infarction area) (mm^2)、中隔壁厚 (septal wall thickness) (mm)、梗塞壁厚 (infarction wall thickness) (mm)、LVの心外膜側周および心内膜側周 (epicardial and endocardial circumference of LV) (mm)、心外膜側および心内膜側の梗塞長 (epicardial and endocardial infarction length) (mm)。

これらの結果から以下の式を用い評価を行った。

$$\% \text{梗塞サイズ} (\% \text{ infarction size}) = \frac{\text{梗塞域}}{\text{総LV域}} \times 100$$

$$\% \text{前/中隔壁厚} (\% \text{ Ant/septal wall thickness}) = \frac{\text{前壁(梗塞)厚}}{\text{中隔壁厚}} \times 100$$

$$\text{生存LV域 (viable LV area)} = (\text{総LV心筋域}) - (\text{梗塞心筋域});$$

$$\% \text{心内膜側梗塞長} (\% \text{ endocardial infarct length}) = \frac{\text{梗塞の心内膜側長}}{\text{LVの心内膜側周}} \times 100;$$

$$\% \text{心外膜側梗塞長} (\% \text{ epicardial infarct length}) = \frac{\text{梗塞の心外膜側長}}{\text{LVの心外膜側周}} \times 100;$$

【0054】

図5に示すように梗塞心筋では梗塞巣さらには左室残存心筋全体にわたる心筋壁のひ薄化、左室内腔の拡大傾向を認め心不全兆候が明らかである。表2に示すようにAng1遺伝子投与群でコントロールと比べ有意な梗塞域の縮小（%梗塞サイズ（%infarction size））、さらに残存心筋量の有意な増加（%生存LV域（% viable LV area））を認め、Ang1の心筋梗塞巣の縮小効果とともに残存心筋に対する効果も明らかであった。また梗塞壁厚を反映する%梗塞厚（%infarct thickness）でも有意な増加をAng1投与群で認めた。

【0055】

【表2】 ラット心筋梗塞後の左心室のAng1遺伝子治療の有無による解剖学的変化

	%梗塞サイズ (n=5)	%前/中隔壁厚	生存 LV 域 (mm ²)	%心内膜梗塞 長	%心外膜梗塞 長
偽手術	—	123±29.0	37.4±9.36	—	—
生理食塩水 (n=14)	31.6±8.66	34.0±7.05	19.8±4.91	44.0±10.8	34.4±8.86
AxCAZ3 (n=8)	34.9±6.69	31.3±4.64	19.2±4.68	52.5±3.99	43.7±7.52
AxCahAng1 (n=20)	21.1±5.38*†	56.5±9.62*‡	27.0±5.20*‡	40.2±13.2‡	30.2±8.82‡

**p* < 0.01 vs 生理食塩水； †*p* < 0.05 vs AxCAZ3

（表の説明）値は平均±SDで示した。LVは左心室を示す。心筋梗塞の4週間後にラットを屠殺した。全てのパラメーターは、心臓の冠動脈結紮部位と心尖部の中間部横断面で測定した。統計解析はBonferroni/Dunnの検定によるANOVAを用いて行なった。

【0056】

【実施例6】 Ang1遺伝子による心筋梗塞後心機能の改善

Ang1による梗塞心での血管新生作用、心筋梗塞巣縮小効果が明らかとなったが、はたしてこれらの効果が心機能の改善に結びついているか否かを検討した。心機能の計測は心エコーを用いM-mode法、B-mode長軸断を用いたArea-length法により評価した。

【0057】

具体的には、LAD結紮の4週間後にエコーカルヂオグラム（LOGIQ500, GE Yokokawa Medical System, Tokyo, Japan）を用いて心機能測定を行った。測定中は、塩酸ケタミン（50 mg/kg）およびキシラジン（2.5mg/kg）を筋注により麻酔を行

なった。10-MHzプローブを用いlong axis viewによりMモードの計測部位を決定した。Mモード法により左室拡張終末期径Edd (end diastolic diameter), 左室収縮終末期径Esd (end systolic diameter)を計測し左室短径短縮率 (FS, fractional shortening) を算出した。

$$FS (\%) = (Edd-Esd)/Edd \times 100$$

またBモードにて心の左室長軸断を描出し、拡張期左室面積 (LVAd, left ventricular area at diastole)、収縮期左室面積 (LVAs, left ventricular area at systole)、拡張期左室長軸径 (LVLd left ventricular long-axis length at diastole)、収縮期左室長軸径 (LVLs, left ventricular long-axis length at systole)を測定し以下の式により左室駆出率 (EF, ejection fraction)を算出した (Area-length法) (Sjaastad, I. et al. (2000) J. Appl. Physiol. 89: 1445-1454)。

$$EF (\%) = [(0.85 \times LVAd^2 / LVLd) - (0.85 \times LVAs^2 / LVLs)] / (0.85 \times LVAd^2 / LVLd) \times 100$$

【0058】

ラット心筋梗塞モデルでの心エコー長軸断層像を図6に示すが、梗塞心では梗塞部である左室前壁のひ薄化とエコー輝度の増加、左室内腔の拡大を明瞭に認め、組織像と同様に心不全所見を呈していた。

心エコーにて測定した各種のパラメーターを表3に示す。心筋梗塞後、生食コントロール群、アデノウイルスコントロール (AxCAZ3) 群いずれもEdd, Esd, LVAd, LVAsの著明な増加を認め、FS, EFも正常心の40-50%と低下しており心筋梗塞後4週目には心エコーパラメーターでも心不全状態を呈していることが確認できた。一方、Ang1遺伝子投与群ではEdd, Esd, LVAdの有意な改善は認められなかつたもののFS, LVAsはコントロールにくらべ増加し、EFも55%と改善していた。

【0059】

【表3】 梗塞心のAng1遺伝子治療における心エコーによる心機能評価

	Mモード評価			2次元評価			
	Edd (mm)	Es _d (mm)	FS (%)	LVAd (mm ²)	LVAs (mm ²)	FAC (%)	EF (%)
偽手術	5.50±0.20	2.50±0.177	54.6±1.99	55.2±9.57	24.6±5.50	55.5±4.82	72.8±5.86
生理食塩水	7.43±1.25	5.86±0.0851	20.8±4.63	75.3±9.03	57.8±1.89	22.6±6.99	36.0±9.46
AxCAZ3	7.54±0.544	5.93±0.693	21.6±4.50	73.7±4.04	54.3±6.66	26.4±5.54	40.5±7.62
AxCahAng1	7.13±0.985	4.69±1.31	34.7±11.1*†	71.6±3.46	45.0±5.12*‡	34.8±5.47*‡	55.0±2.16*‡

*, p < 0.05 vs. 生理食塩水; †, p < 0.05 vs. AxCAZ3

(表の説明) 梗塞の4週間後、 1×10^{10} opuのAxCAZ3またはAxCahAng1で処理した心臓の心機能を心エコーカルヂオグラフィーによるMモードおよびArea-length法を用いて測定した。値は平均±SDで示した。Eddは左室拡張終末期径 (end diastolic diameter)、Es_dは左室収縮終末期径 (end systolic diameter)、FSは左室短径短縮率 (fractional shortening)、LVAdは拡張期左室面積 (left ventricular area at diastole)、LVAsは収縮期左室面積 (left ventricular area at systole)、FACは左室内腔面積変化率 (fractional area change)、EFは左室駆出率 (ejection fraction) を表す。統計解析はBonferroni/Dunnの検定によるANOVAを用いて行なった。

【0060】

【実施例7】 マウス急性下肢虚血モデルに対するAng1遺伝子単独投与による壞死抑制効果

下肢急性虚血は、心筋虚血と同様に組織VEGF産生が亢進する。そこでマウス急性下肢虚血モデルを作製し、Ang1発現アデノウイルスベクターの単独投与により虚血治療を試みた。C3H/HeN マウス (male, 20-25 g) を用いてCouffinhalらの方法 (Couffinhal T et al. (1998) Am J Pathol 152(6):1667-79) に準じ下肢虚血モデルを作製した。全身麻酔下はケタラール (50 mg/kg)、キシラジン (20 mg/kg) を筋注した。両下肢の悌毛後、左鼠径部を切開、左大腿動脈とその全分枝を露出した。大腿動脈起始部7-0ナイロン縫合糸を用いて結紮、さらに膝窩動脈と伏在動脈の分岐部直前で同様に結紮した。また他の全分枝を結紮後、左大腿動脈を切除・除去した。切開創を縫合閉鎖し手術を終了した。

【0061】

Ang1発現アデノウイルス AxCahAng1 (opu/pfu比は13.3) は上記と同様に作製

した。AxCAhAng1 (1×10^{10} opu/匹) を、下肢虚血を作製直後に左大腿部・内転筋及び左腓腹筋に 2.5×10^9 opu / $25\mu l$ を各2カ所ずつ、計4カ所に29G針付き1.0 ml注射器により筋肉内投与した。対照群には虚血作製マウス5匹を使用した。モデル作製3日後、9または10日後に壞死部の確認、肢指脱落、下肢脱落、潰瘍形成を肉眼により確認し、虚血の評価を行った。

【0062】

対照群ではモデル作製3日後に壞死部の確認(3/5)、肢指脱落(2/5)、下肢脱落(0/5)、潰瘍形成(1/5)を認め、さらに9日後には壞死部の確認(3/5)、肢指脱落(3/5)、下肢脱落(0/5)、潰瘍形成(1/5)と虚血の進行を認めた。一方、Ang1群ではモデル作製3日後に壞死部の確認(0/5)、肢指脱落(0/5)、下肢脱落(0/5)、潰瘍形成(2/5)を認め、さらに9日後には壞死部の確認(3/5)、肢指脱落(1/5)、下肢脱落(0/5)、潰瘍形成(2/5)と虚血の進行が抑制されていた。結果を図7に示した。

【0063】

Ang1発現アデノウイルスの単独投与により、肢指脱落、下肢脱落の明らかな抑制効果を認めた。虚血3日目の患肢の状況を検討したところAng1投与肢では対照に比べ明らかに虚血による変化は軽減されていた。血管新生には萌出、分岐など多くのステップがある。特に組織還流を促す機能的な血管の形成には動脈新生(arteriogenesis)が関与し、主に虚血10日以後と血管新生の後期に観察される。したがって今回観察されたAng1の早期の効果は血管新生によるものとは考え難く、血管新生以外の機序が推定される。Ang1はTie-2を介しPI3キナーゼを活性化し、抗アポトーシス作用有するAktを活性化することが知られている。またTie-2を介し血管内皮アポトーシス抑制効果を有するNO産生を亢進させる。これらのAng1の作用により血管内皮細胞のアポトーシスを抑制し、虚血の進展を抑制した可能性がある。

急性虚血によりもたらされるVEGFの産生亢進は組織浮腫を増悪させ、組織還流の更なる低下をもたらすと推定される。実際、本モデルでVEGFを高発現させると、下肢の壞死脱落を促進することが報告されている。本実施例においては、Ang1を虚血急性期に投与することにより還流低下につながる浮腫の進展を抑制したと

推測される。Ang1投与群では9日目でも肢指脱落を伴う高度の壊死は1例に観察されるのみであった。

以上、急性下肢虚血モデルにAng1を投与することにより壊死の進展を抑制し、壊死後の肢脱落より救肢できることが確認された。

【0064】

【実施例8】 Nakedプラスミドによる骨格筋および心筋へのAng1遺伝子導入

Nakedプラスミドを直接組織に注入することは、最も安全で簡便な遺伝子送達方法であり、これまで承認された臨床の心血管遺伝子治療プロトコルの多くにおいて、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターをベースにしたプラスミドが採用されている。Nakedプラスミド注入に主要な限界の1つは導入遺伝子の発現レベルが低いことである。CAプロモーター(サイトメガロウイルスエンハンサーを持つニワトリ β アクチンプロモーター)は、in vitroおよびin vivoにおける最も強力な転写制御モジュールの1つである。しかしながら、CAプロモーターにより駆動される遺伝子発現は細胞および器官の種類に依存する。実際、CAプロモーターベースのベクターを用いてnakedプラスミドの注入することによって、心組織で適切なレベルの導入遺伝子の発現が得られるかは不明である。そこで、CAプロモーターをベースにしたnakedプラスミドを作製し、心筋への直接注入による導入遺伝子に発現レベルを検討した。

【0065】

pIND/lacZ(Invitrogen社)からEscherichia coli β ガラクトシダーゼ(LacZ)遺伝子を切り出し、pcDNA3ベクター(Invitrogen社)、CAプロモーターを持つpCAGGSベクター(Niwa, M. et al., Gene 1991; 108: 193-199)、およびpCAGGSからsimian virus複製origin(SV40ori)を欠失したpCA1に組み込み、それぞれpcDNA3LacZ、pCAZ2、およびpCA1LacZとした。なお、pCAZ2はYoshida et al., Hum. Gene Ther. 9:2503-2515, 1998に記載されているプラスミドpCAZ2を用いた。また、pCA1は、pCAGGSをBamHIとHindIIIで切断してSV40oriを含む断片(522 bp)を除いて作製した。その後、切断したプラスミドの5'端のT4 DNAポリメラーゼでfill inし、T4 DNAリガーゼでライゲーションして発現ベクターpCA1とした。全てのプラスミドはEndofree Maxi kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を

用いて精製した。

【0066】

0.1 mlの0.9%生理食塩水中の $20\mu\text{g}$ のnakedプラスミドを、27ゲージの注射針を持つ1 mlシリンジを用いて、Lewisラット（雄、8週齢、250~300 g重、Sankyo Labo Service (Tokyo, Japan)）の骨格筋または心臓に注入した。0.1 mlの0.9%生理食塩水中のAxCAZ3アデノウイルス粒子 (10^{10} , 5×10^9 , および 10^9 OPU) も同様に心臓に注入した。骨格筋への注入では、後肢の大腿筋への注入を容易にするため2 cm切開した (Wolff, J.A. et al., Science 1990; 247: 1465-1468)。心臓への注入では、左胸を開胸しnakedプラスミドまたはアデノウイルス粒子を心尖部に注入した (Lin, H. et al., Circulation 1990; 82: 2217-2221)。注入後、切開部を絹縫合糸で縫合した。

【0067】

骨格筋および心臓における β -gal活性を以前のように解析した (Shaper, N.L. et al., J Biol Chem 1994; 269: 25165-25171)。具体的には、4 mlの組織溶解液 (100 mM リン酸カリウム, 0.2% Triton X-100, 2 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, および 0.5 mM dithiothreitol, pH 7.8) 中で1分間組織 (0.8~1.0 g) をホモジエナイズした。ホモジエナイズした組織は、続いて12,000 $\times g$ で10分遠心した。上清を回収し、48°Cで1時間加熱して内在性の β ガラクトシダーゼ活性を不活化した。上清中の β -gal活性はGalacto-LightTM Plus kit (Tropix, Bedford, MA) により、製造元のプロトコルに従って測定した。ケミルミネッセンスはMicroLumat LB96 ルミノメーター (Wallac, Gaithersburg, MD) を用いて検出した。Relative light units (RLUs) として得られたデータは、組み換え β ガラクトシダーゼ標準 (Roche Diagnostics, Manheim, Germany) を用いてLacZのng活性に変換した。LacZの組織化学的検出では、 $10\mu\text{m}$ の心組織凍結切片をまずX-gal溶液で37°Cで24時間染色 (Nabel, E.G. et al., Science 1989; 244: 1342-1344) し、その後エオシンで対比染色した。値は平均±S.E. で表した。統計学的解析は、Scheffeの検定を行った。0.05未満のp値を有意とする。

【0068】

ここで用いたnakedプラスミド量 ($20\mu\text{g}$) は、虚血肢 (Losordo, D.W. et al., Circulation 1998; 98: 2800-2804) および心疾患 (Baumgartner, I. et al., Circulation 1998; 97: 1114-1123) の臨床遺伝子治療の試行において用いられた用量 (g/kg) と相同である。前者は、計4 mgのnaked DNAが用いられ、後者では $200\sim2,000\mu\text{g}$ のnaked DNAが用いられた。ここでは、CAプロモーターおよびCMVプロモーターベースのベクターからのレポーター遺伝子の発現を、ラット骨格筋および心臓において調べた。2つの組織は、臨床心血管遺伝子治療におけるnakedプラスミドの注入部位として共によく知られている。後肢の大腿筋 (n=4) および心臓 (n=4) にプラスミドを注入してから5日後に、CMVプロモーター (pcDNA3LacZ, pCMV β) およびCAプロモーター (pCAZ2, pCA1LacZ) ベースのベクターに媒介されるLacZの発現は、骨格筋においてそれぞれ 1.6 ± 0.4 、 10.2 ± 2.0 、 37.2 ± 6.9 、および $27.2\pm6.8\text{ ng}$ であった (図8A)。骨格筋において、CAプロモーターベースのベクターはCMVプロモーターベースのベクターよりもレポーター遺伝子の発現レベルが高かった。同様に、心臓では、CAプロモーターベースのベクターの導入遺伝子発現 (pCAZ2, $510.8\pm69.8\text{ ng}$; pCA1LacZ, $509.9\pm66.7\text{ ng}$) は、CMVプロモーターベースのベクターの場合 (pcDNA3LacZ, $46.2\pm13.2\text{ ng}$; pCMV β , $108.8\pm37.8\text{ ng}$) と比較して優れていた。心臓における導入遺伝子の発現レベルは、全てのプラスミドにおいて骨格筋で観察されたものよりも約一桁高いことが判明した (図8B)。安全性を向上させるためSV40ori配列を取り除いたpCA1LacZベクターに関しても、導入遺伝子の発現を検討した。図8に示したように、骨格筋または心臓のどちらにおいても、pCA1LacZとpCAZ2との間でLacZの発現について有意な違いは見られなかった。

【0069】

心臓における、CAプロモーターベースのプラスミドベクターとアデノウイルスベクターとの間のLacZ発現の比較を行なった。様々な量のアデノウイルスベクター AxCAZ3 (10^{10} 、 5×10^9 、 10^9 OPU) を心臓の心尖部に注入した (n=4)。5日後に、AxCAZ3を注入した心臓におけるLacZの発現レベルを、 $20\mu\text{g}$ のpCAZ2を注入した心組織と比較した。その結果、 $20\mu\text{g}$ のpCAZ2に媒介される心臓における導入遺伝子発現の平均レベルは、 6.0×10^9 OPUのAxCAZ3によるものとほぼ同等であるこ

とが判明した（図9）。

【0070】

pcDNA3LacZ (20 μg)、pCAZ2 (20 μg)、または 5×10⁹ OPUのAxCAZ3を注入し、その後X-galで染色した。LacZ陽性筋細胞が調べた全てのグループの試料において検出された。pcDNA3LacZを注入した心試料では、針を注入した部位周辺にほとんどLacZ陽性細胞は見られなかった。これに対して、pCAZ2の場合は、散発的ではあるが発現の強いLacZ陽性心筋細胞が注入領域周辺に観察された。5×10⁹ OPUのAxCAZ3を注入した心組織は、pCAZ2を注入したもので見られたのと類似した導入遺伝子発現のレベルおよびパターンを示した。以上のように、プラスミドの直接投与は心筋においては極めて効率的に導入遺伝子を発現することができ、特にCAプロモーターを用いることにより、アデノウイルスベクターとほぼ同等の高いレベルの発現が得られることが実証された。

【0071】

【発明の効果】

本発明により、虚血疾患に対する新たな遺伝子治療剤および治療方法が提供された。本発明の方法は、副作用の少ない、安全で効果的な虚血治療法として優れている。現在、急性心筋梗塞に対する治療はPTCA（経皮冠動脈形成術）・CABG（冠動脈バイパス術）など外科的な血行再建術が主体であるが、本発明の方法を用いることにより遺伝子工学的な血管再生促進が可能となる。これにより、心機能の積極的な改善、病床期間の短期化が期待される。

【0072】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVAC RESEARCH INC.

<120> Methods for treating ischemic diseases

<130> D3-A0208

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3372

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (3372)

<223>

<400> 1

atg gac tct tta gcc agc tta gtt ctc tgt gga gtc agc ttg ctc ctt 48
 Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu
 1 5 10 15

tct gga act gtg gaa ggt gcc atg gac ttg atc ttg atc aat tcc cta 96
 Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu
 20 25 30

cct ctt gta tct gat gct gaa aca tct ctc acc tgc att gcc tct ggg 144
 Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly
 35 40 45

tgg cgc ccc cat gag ccc atc acc ata gga agg gac ttt gaa gcc tta 192

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu
 50 55 60

atg aac cag cac cag gat ccg ctg gaa gtt act caa gat gtg acc aga 240
 Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg
 65 70 75 80

gaa tgg gct aaa aaa gtt gtt tgg aag aga gaa aag gct agt aag atc 288
 Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile
 85 90 95

aat ggt gct tat ttc tgt gaa ggg cga gtt cga gga gag gca atc agg 336
 Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg
 100 105 110

ata cga acc atg aag atg cgt caa caa gct tcc ttc cta cca gct act 384
 Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr
 115 120 125

tta act atg act gtg gac aag gga gat aac gtg aac ata tct ttc aaa 432
 Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys
 130 135 140

aag gta ttg att aaa gaa gaa gat gca gtg att tac aaa aat ggt tcc 480
 Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser
 145 150 155 160

ttc atc cat tca gtg ccc cgcat gaa gta cct gat att cta gaa gta 528
 Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val

165

170

175

cac ctg cct cat gct cag ccc cag gat gct gga gtg tac tcg gcc agg 576
 His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg
 180 185 190

tat ata gga gga aac ctc ttc acc tcg gcc ttc acc agg ctg ata gtc 624
 Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val
 195 200 205

cgg aga tgt gaa gcc cag aag tgg gga cct gaa tgc aac cat ctc tgt 672
 Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys
 210 215 220

act gct tgt atg aac aat ggt gtc tgc cat gaa gat act gga gaa tgc 720
 Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
 225 230 235 240

att tgc cct cct ggg ttt atg gga agg acg tgt gag aag gct tgt gaa 768
 Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
 245 250 255

ctg cac acg ttt ggc aga act tgt aaa gaa agg tgc agt gga caa gag 816
 Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
 260 265 270

gga tgc aag tct tat gtg ttc tgt ctc cct gac ccc tat ggg tgt tcc 864
 Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser
 275 280 285

tgt gcc aca ggc tgg aag ggt ctg cag tgc aat gaa gca tgc cac cct 912
 Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro

290 295 300

ggt ttt tac ggg cca gat tgt aag ctt agg tgc agc tgc aac aat ggg 960
 Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
 305 310 315 320

gag atg tgt gat cgc ttc caa gga tgt ctc tgc tct cca gga tgg cag 1008
 Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
 325 330 335

ggg ctc cag tgt gag aga gaa ggc ata ccg agg atg acc cca aag ata 1056
 Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
 340 345 350

gtg gat ttg cca gat cat ata gaa gta aac agt ggt aaa ttt aat ccc 1104
 Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro
 355 360 365

att tgc aaa gct tct ggc tgg ccg cta cct act aat gaa gaa atg acc 1152
 Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr
 370 375 380

ctg gtg aag ccg gat ggg aca gtg ctc cat cca aaa gac ttt aac cat 1200
 Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His
 385 390 395 400

acg gat cat ttc tca gta gcc ata ttc acc atc cac cgg atc ctc ccc Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro	1248
405 410 415	
 cct gac tca gga gtt tgg gtc tgc agt gtg aac aca gtg gct ggg atg Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met	1296
420 425 430	
 gtg gaa aag ccc ttc aac att tct gtt aaa gtt ctt cca aag ccc ctg Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu	1344
435 440 445	
 aat gcc cca aac gtg att gac act gga cat aac ttt gct gtc atc aac Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn	1392
450 455 460	
 atc agc tct gag cct tac ttt ggg gat gga cca atc aaa tcc aag aag Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys	1440
465 470 475 480	
 ctt cta tac aaa ccc gtt aat cac tat gag gct tgg caa cat att caa Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln	1488
485 490 495	
 gtg aca aat gag att gtt aca ctc aac tat ttg gaa cct cgg aca gaa Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu	1536
500 505 510	
 tat gaa ctc tgt gtg caa ctg gtc cgt cgt gga gag ggt ggg gaa ggg	1584

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Gly Glu Gly
 515 520 525

cat cct gga cct gtg aga cgc ttc aca aca gct tct atc gga ctc cct 1632
 His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro
 530 535 540

cct cca aga ggt cta aat ctc ctg cct aaa agt cag acc act cta aat 1680
 Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn
 545 550 555 560

ttg acc tgg caa cca ata ttt cca agc tcg gaa gat gac ttt tat gtt 1728
 Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val
 565 570 575

gaa gtg gag aga agg tct gtg caa aaa agt gat cag cag aat att aaa 1776
 Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys
 580 585 590

gtt cca ggc aac ttg act tcg gtg cta ctt aac aac tta cat ccc agg 1824
 Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg
 595 600 605

gag cag tac gtg gtc cga gct aga gtc aac acc aag gcc cag ggg gaa 1872
 Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu
 610 615 620

tgg agt gaa gat ctc act gct tgg acc ctt agt gac att ctt cct cct 1920
 Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro

625

630

635

640

caa cca gaa aac atc aag att tcc aac att aca cac tcc tcg gct gtg 1968
 Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val

645

650

655

att tct tgg aca ata ttg gat ggc tat tct att tct tct att act atc 2016
 Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile
 660 665 670

cgt tac aag gtt caa ggc aag aat gaa gac cag cac gtt gat gtg aag 2064
 Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys
 675 680 685

ata aag aat gcc acc atc att cag tat cag ctc aag ggc cta gag cct 2112
 Ile Lys Asn Ala Thr Ile Ile Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
 690 695 700

gaa aca gca tac cag gtg gac att ttt gca gag aac aac ata ggg tca 2160
 Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
 705 710 715 720

agc aac cca gcc ttt tct cat gaa ctg gtg acc ctc cca gaa tct caa 2208
 Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
 725 730 735

gca cca gcg gac ctc gga ggg aag atg ctg ctt ata gcc atc ctt 2256
 Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
 740 745 750

ggc tct gct gga atg acc tgc ctg act gtg ctg ttg gcc ttt ctg atc 2304
 Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
 755 760 765

ata ttg caa ttg aag agg gca aat gtg caa agg aga atg gcc caa gcc 2352
 Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
 770 775 780

ttc caa aac gtg agg gaa cca gct gtg cag ttc aac tca ggg act 2400
 Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
 785 790 795 800

ctg gcc cta aac agg aag gtc aaa aac aac cca gat cct aca att tat 2448
 Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
 805 810 815

cca gtg ctt gac tgg aat gac atc aaa ttt caa gat gtg att ggg gag 2496
 Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
 820 825 830

ggc aat ttt ggc caa gtt ctt aag gcg cgc atc aag aag gat ggg tta 2544
 Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu
 835 840 845

cgg atg gat gct gcc atc aaa aga atg aaa gaa tat gcc tcc aaa gat 2592
 Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp
 850 855 860

gat cac agg gac ttt gca gga gaa ctg gaa gtt ctt tgt aaa ctt gga			2640
Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly			
865	870	875	880
cac cat cca aac atc atc aat ctc tta gga gca tgt gaa cat cga ggc			2688
His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly			
885	890	895	
tac ttg tac ctg gcc att gag tac gcg ccc cat gga aac ctt ctg gac			2736
Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp			
900	905	910	
ttc ctt cgc aag agc cgt gtg ctg gag acg gac cca gca ttt gcc att			2784
Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile			
915	920	925	
gcc aat agc acc gcg tcc aca ctg tcc tcc cag cag ctc ctt cac ttc			2832
Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe			
930	935	940	
gct gcc gac gtg gcc cgg ggc atg gac tac ttg agc caa aaa cag ttt			2880
Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe			
945	950	955	960
atc cac agg gat ctg gct gcc aga aac att tta gtt ggt gaa aac tat			2928
Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr			
965	970	975	
gtg gca aaa ata gca gat ttt gga ttg tcc cga ggt caa gag gtg tac			2976

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr

980

985

990

gtg aaa aag aca atg gga agg ctc cca gtg cgc tgg atg gcc atc gag 3024

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu

995

1000

1005

tca ctg aat tac agt gtg tac aca acc aac agt gat gta tgg tcc 3069

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser

1010

1015

1020

tat ggt gtg tta cta tgg gag att gtt agc tta gga ggc aca ccc 3114

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro

1025

1030

1035

tac tgc ggg atg act tgt gca gaa ctc tac gag aag ctg ccc cag 3159

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln

1040

1045

1050

ggc tac aga ctg gag aag ccc ctg aac tgt gat gat gag gtg tat 3204

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr

1055

1060

1065

gat cta atg aga caa tgc tgg cgg gag aag cct tat gag agg cca 3249

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro

1070

1075

1080

tca ttt gcc cag ata ttg gtg tcc tta aac aga atg tta gag gag 3294

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu

1085 1090 1095

cga aag acc tac gtg aat acc acg ctt tat gag aag ttt act tat 3339

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr

1100 1105 1110

gca gga att gac tgt tct gct gaa gaa gcg gcc 3372

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala

1115 1120

<210> 2

<211> 1124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Ser Leu Ala Ser Leu Val Leu Cys Gly Val Ser Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Gly Thr Val Glu Gly Ala Met Asp Leu Ile Leu Ile Asn Ser Leu

20 25 30

Pro Leu Val Ser Asp Ala Glu Thr Ser Leu Thr Cys Ile Ala Ser Gly

35 40 45

Trp Arg Pro His Glu Pro Ile Thr Ile Gly Arg Asp Phe Glu Ala Leu

50 55 60

Met Asn Gln His Gln Asp Pro Leu Glu Val Thr Gln Asp Val Thr Arg			
65	70	75	80
Glu Trp Ala Lys Lys Val Val Trp Lys Arg Glu Lys Ala Ser Lys Ile			
85	90	95	
Asn Gly Ala Tyr Phe Cys Glu Gly Arg Val Arg Gly Glu Ala Ile Arg			
100	105	110	
Ile Arg Thr Met Lys Met Arg Gln Gln Ala Ser Phe Leu Pro Ala Thr			
115	120	125	
Leu Thr Met Thr Val Asp Lys Gly Asp Asn Val Asn Ile Ser Phe Lys			
130	135	140	
Lys Val Leu Ile Lys Glu Glu Asp Ala Val Ile Tyr Lys Asn Gly Ser			
145	150	155	160
Phe Ile His Ser Val Pro Arg His Glu Val Pro Asp Ile Leu Glu Val			
165	170	175	
His Leu Pro His Ala Gln Pro Gln Asp Ala Gly Val Tyr Ser Ala Arg			
180	185	190	
Tyr Ile Gly Gly Asn Leu Phe Thr Ser Ala Phe Thr Arg Leu Ile Val			
195	200	205	
Arg Arg Cys Glu Ala Gln Lys Trp Gly Pro Glu Cys Asn His Leu Cys			
210	215	220	

Thr Ala Cys Met Asn Asn Gly Val Cys His Glu Asp Thr Gly Glu Cys
225 230 235 240

Ile Cys Pro Pro Gly Phe Met Gly Arg Thr Cys Glu Lys Ala Cys Glu
245 250 255

Leu His Thr Phe Gly Arg Thr Cys Lys Glu Arg Cys Ser Gly Gln Glu
260 265 270

Gly Cys Lys Ser Tyr Val Phe Cys Leu Pro Asp Pro Tyr Gly Cys Ser
275 280 285

Cys Ala Thr Gly Trp Lys Gly Leu Gln Cys Asn Glu Ala Cys His Pro
290 295 300

Gly Phe Tyr Gly Pro Asp Cys Lys Leu Arg Cys Ser Cys Asn Asn Gly
305 310 315 320

Glu Met Cys Asp Arg Phe Gln Gly Cys Leu Cys Ser Pro Gly Trp Gln
325 330 335

Gly Leu Gln Cys Glu Arg Glu Gly Ile Pro Arg Met Thr Pro Lys Ile
340 345 350

Val Asp Leu Pro Asp His Ile Glu Val Asn Ser Gly Lys Phe Asn Pro
355 360 365

Ile Cys Lys Ala Ser Gly Trp Pro Leu Pro Thr Asn Glu Glu Met Thr

370

375

380

Leu Val Lys Pro Asp Gly Thr Val Leu His Pro Lys Asp Phe Asn His

385

390

395

400

Thr Asp His Phe Ser Val Ala Ile Phe Thr Ile His Arg Ile Leu Pro

405

410

415

Pro Asp Ser Gly Val Trp Val Cys Ser Val Asn Thr Val Ala Gly Met

420

425

430

Val Glu Lys Pro Phe Asn Ile Ser Val Lys Val Leu Pro Lys Pro Leu

435

440

445

Asn Ala Pro Asn Val Ile Asp Thr Gly His Asn Phe Ala Val Ile Asn

450

455

460

Ile Ser Ser Glu Pro Tyr Phe Gly Asp Gly Pro Ile Lys Ser Lys Lys

465

470

475

480

Leu Leu Tyr Lys Pro Val Asn His Tyr Glu Ala Trp Gln His Ile Gln

485

490

495

Val Thr Asn Glu Ile Val Thr Leu Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Thr Glu

500

505

510

Tyr Glu Leu Cys Val Gln Leu Val Arg Arg Gly Glu Gly Glu Gly

515

520

525

His Pro Gly Pro Val Arg Arg Phe Thr Thr Ala Ser Ile Gly Leu Pro

530 535 540

Pro Pro Arg Gly Leu Asn Leu Leu Pro Lys Ser Gln Thr Thr Leu Asn

545 550 555 560

Leu Thr Trp Gln Pro Ile Phe Pro Ser Ser Glu Asp Asp Phe Tyr Val

565 570 575

Glu Val Glu Arg Arg Ser Val Gln Lys Ser Asp Gln Gln Asn Ile Lys

580 585 590

Val Pro Gly Asn Leu Thr Ser Val Leu Leu Asn Asn Leu His Pro Arg

595 600 605

Glu Gln Tyr Val Val Arg Ala Arg Val Asn Thr Lys Ala Gln Gly Glu

610 615 620

Trp Ser Glu Asp Leu Thr Ala Trp Thr Leu Ser Asp Ile Leu Pro Pro

625 630 635 640

Gln Pro Glu Asn Ile Lys Ile Ser Asn Ile Thr His Ser Ser Ala Val

645 650 655

Ile Ser Trp Thr Ile Leu Asp Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ile Thr Ile

660 665 670

Arg Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Glu Asp Gln His Val Asp Val Lys

675 680 685

Ile Lys Asn Ala Thr Ile Gln Tyr Gln Leu Lys Gly Leu Glu Pro
690 695 700

Glu Thr Ala Tyr Gln Val Asp Ile Phe Ala Glu Asn Asn Ile Gly Ser
705 710 715 720

Ser Asn Pro Ala Phe Ser His Glu Leu Val Thr Leu Pro Glu Ser Gln
725 730 735

Ala Pro Ala Asp Leu Gly Gly Lys Met Leu Leu Ile Ala Ile Leu
740 745 750

Gly Ser Ala Gly Met Thr Cys Leu Thr Val Leu Leu Ala Phe Leu Ile
755 760 765

Ile Leu Gln Leu Lys Arg Ala Asn Val Gln Arg Arg Met Ala Gln Ala
770 775 780

Phe Gln Asn Val Arg Glu Glu Pro Ala Val Gln Phe Asn Ser Gly Thr
785 790 795 800

Leu Ala Leu Asn Arg Lys Val Lys Asn Asn Pro Asp Pro Thr Ile Tyr
805 810 815

Pro Val Leu Asp Trp Asn Asp Ile Lys Phe Gln Asp Val Ile Gly Glu
820 825 830

Gly Asn Phe Gly Gln Val Leu Lys Ala Arg Ile Lys Lys Asp Gly Leu

835

840

845

Arg Met Asp Ala Ala Ile Lys Arg Met Lys Glu Tyr Ala Ser Lys Asp

850

855

860

Asp His Arg Asp Phe Ala Gly Glu Leu Glu Val Leu Cys Lys Leu Gly

865

870

875

880

His His Pro Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Glu His Arg Gly

885

890

895

Tyr Leu Tyr Leu Ala Ile Glu Tyr Ala Pro His Gly Asn Leu Leu Asp

900

905

910

Phe Leu Arg Lys Ser Arg Val Leu Glu Thr Asp Pro Ala Phe Ala Ile

915

920

925

Ala Asn Ser Thr Ala Ser Thr Leu Ser Ser Gln Gln Leu Leu His Phe

930

935

940

Ala Ala Asp Val Ala Arg Gly Met Asp Tyr Leu Ser Gln Lys Gln Phe

945

950

955

960

Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn Tyr

965

970

975

Val Ala Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ser Arg Gly Gln Glu Val Tyr

980

985

990

Val Lys Lys Thr Met Gly Arg Leu Pro Val Arg Trp Met Ala Ile Glu
995 1000 1005

Ser Leu Asn Tyr Ser Val Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Val Trp Ser
1010 1015 1020

Tyr Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Val Ser Leu Gly Gly Thr Pro
1025 1030 1035

Tyr Cys Gly Met Thr Cys Ala Glu Leu Tyr Glu Lys Leu Pro Gln
1040 1045 1050

Gly Tyr Arg Leu Glu Lys Pro Leu Asn Cys Asp Asp Glu Val Tyr
1055 1060 1065

Asp Leu Met Arg Gln Cys Trp Arg Glu Lys Pro Tyr Glu Arg Pro
1070 1075 1080

Ser Phe Ala Gln Ile Leu Val Ser Leu Asn Arg Met Leu Glu Glu
1085 1090 1095

Arg Lys Thr Tyr Val Asn Thr Thr Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Tyr
1100 1105 1110

Ala Gly Ile Asp Cys Ser Ala Glu Glu Ala Ala
1115 1120

<211> 1494

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1494)

<223>

<400> 3

atg aca gtt ttc ctt tcc ttt gct ttc ctc gct gcc att ctg act cac 48
 Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
 1 5 10 15

ata ggg tgc agc aat cag cgc cga agt cca gaa aac agt ggg aga aga 96
 Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
 20 25 30

tat aac cg^g att caa cat gg^g caa tgt gc^c tac act tt^c att ct^t cc^a 144
 Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
 35 40 45

aac gct ctg cag aga gat gct cca cac gtg gaa ccg gat ttc tct tcc 240
Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
65 70 75 80

cag aaa ctt caa cat ctg gaa cat gtg atg gaa aat tat act cag tgg			288
Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp			
85	90	95	
ctg caa aaa ctt gag aat tac att gtg gaa aac atg aag tcg gag atg			336
Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met			
100	105	110	
gcc cag ata cag cag aat gca gtt cag aac cac acg gct acc atg ctg			384
Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu			
115	120	125	
gag ata gga acc agc ctc ctc tct cag act gca gag cag acc aga aag			432
Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys			
130	135	140	
ctg aca gat gtt gag acc cag gta cta aat caa act tct cga ctt gag			480
Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu			
145	150	155	160
ata cag ctg ctg gag aat tca tta tcc acc tac aag cta gag aag caa			528
Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln			
165	170	175	
ctt ctt caa cag aca aat gaa atc ttg aag atc cat gaa aaa aac agt			576
Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser			
180	185	190	

tta tta gaa cat aaa atc tta gaa atg gaa gga aaa cac aag gaa gag Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu	624
195 200 205	
ttg gac acc tta aag gaa gag aaa gag aac ctt caa ggc ttg gtt act Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr	672
210 215 220	
cgt caa aca tat ata atc cag gag ctg gaa aag caa tta aac aga gct Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala	720
225 230 235 240	
acc acc aac aac agt gtc ctt cag aag cag caa ctg gag ctg atg gac Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Gln Leu Glu Leu Met Asp	768
245 250 255	
aca gtc cac aac ctt gtc aat ctt tgc act aaa gaa ggt gtt tta cta Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu	816
260 265 270	
aag gga gga aaa aga gag gaa gag aaa cca ttt aga gac tgt gca gat Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp	864
275 280 285	
gta tat caa gct ggt ttt aat aaa agt gga atc tac act att tat att Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile	912
290 295 300	
aat aat atg cca gaa ccc aaa aag gtg ttt tgc aat atg gat gtc aat	960

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn
 305 310 315 320

ggg gga ggt tgg act gta ata caa cat cgt gaa gat gga agt cta gat 1008
 Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp
 325 330 335

ttc caa aga ggc tgg aag gaa tat aaa atg ggt ttt gga aat ccc tcc 1056
 Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser
 340 345 350

ggt gaa tat tgg ctg ggg aat gag ttt att ttt gcc att acc agt cag 1104
 Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln
 355 360 365

agg cag tac atg cta aga att gag tta atg gac tgg gaa ggg aac cga 1152
 Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg
 370 375 380

gcc tat tca cag tat gac aga ttc cac ata gga aat gaa aag caa aac 1200
 Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn
 385 390 395 400

tat agg ttg tat tta aaa ggt cac act ggg aca gca gga aaa cag agc 1248
 Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser
 405 410 415

agc ctg atc tta cac ggt gct gat ttc agc act aaa gat gct gat aat 1296
 Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn

420 425 430

gac aac tgt atg tgc aaa tgt gcc ctc atg tta aca gga gga tgg tgg 1344
Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp

435 440 445

ttt gat gct tgt ggc ccc tcc aat cta aat gga atg ttc tat act gcg 1392
Phe Asn Ala Cys Glu Pro Ser Ile Ile Val Gln

150 155

gga caa aac cat gga aaa ctg aat ggg ata aag tgg cac tac ttc aaa 1440
Glu Glu Asn Val Gln Lys Lys Glu Lys Cys Tyr Phe Glu

My llys leu han er ym Llys Hw mrs llyr ym Llys

ggg ccc agt tac tcc tta cgt tcc aca act atg atg att cga cct tta 1488
Gly Pro Ser Thr Ser Isoleucine Alanine

167
g You are the met met the big no

gat ttt

Acta Phys.

<210> 4

<211> 498

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Thr Val Phe Leu Ser Phe Ala Phe Leu Ala Ala Ile Leu Thr His
1 5 10 15

Ile Gly Cys Ser Asn Gln Arg Arg Ser Pro Glu Asn Ser Gly Arg Arg
20 25 30

Tyr Asn Arg Ile Gln His Gly Gln Cys Ala Tyr Thr Phe Ile Leu Pro
35 40 45

Glu His Asp Gly Asn Cys Arg Glu Ser Thr Thr Asp Gln Tyr Asn Thr
50 55 60

Asn Ala Leu Gln Arg Asp Ala Pro His Val Glu Pro Asp Phe Ser Ser
65 70 75 80

Gln Lys Leu Gln His Leu Glu His Val Met Glu Asn Tyr Thr Gln Trp
85 90 95

Leu Gln Lys Leu Glu Asn Tyr Ile Val Glu Asn Met Lys Ser Glu Met
100 105 110

Ala Gln Ile Gln Gln Asn Ala Val Gln Asn His Thr Ala Thr Met Leu
115 120 125

Glu Ile Gly Thr Ser Leu Leu Ser Gln Thr Ala Glu Gln Thr Arg Lys
130 135 140

Leu Thr Asp Val Glu Thr Gln Val Leu Asn Gln Thr Ser Arg Leu Glu
145 150 155 160

Ile Gln Leu Leu Glu Asn Ser Leu Ser Thr Tyr Lys Leu Glu Lys Gln
165 170 175

Leu Leu Gln Gln Thr Asn Glu Ile Leu Lys Ile His Glu Lys Asn Ser
180 185 190

Leu Leu Glu His Lys Ile Leu Glu Met Glu Gly Lys His Lys Glu Glu
195 200 205

Leu Asp Thr Leu Lys Glu Glu Lys Glu Asn Leu Gln Gly Leu Val Thr
210 215 220

Arg Gln Thr Tyr Ile Ile Gln Glu Leu Glu Lys Gln Leu Asn Arg Ala
225 230 235 240

Thr Thr Asn Asn Ser Val Leu Gln Lys Gln Leu Glu Leu Met Asp
245 250 255

Thr Val His Asn Leu Val Asn Leu Cys Thr Lys Glu Gly Val Leu Leu
260 265 270

Lys Gly Gly Lys Arg Glu Glu Lys Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp
275 280 285

Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile
290 295 300

Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn

305

310

315

320

Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp

325

330

335

Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser

340

345

350

Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln

355

360

365

Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg

370

375

380

Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn

385

390

395

400

Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser

405

410

415

Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn

420

425

430

Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp

435

440

445

Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala

450

455

460

Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu
 485 490 495

Asp Phe

<210> 5

<211> 1744

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence

<400> 5

actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagccata tatggagttc	60
cgcgttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgcccc	120
ttgacgtcaa taatgacgta tttccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt	180
caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg	240
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag	300
tacatgacct tatggactt tcctacttgg cagtacatct acgtatttagt catcgctatt	360
accatggtcg aggtgagccc cacgttctgc ttcaacttcc ccatctcccc cccctcccc	420
cccccaattt tgtatttatt tatttttaa ttattttgtg cagcgatggg ggcgggggggg	480
ggggggggggc gcgccagg cggggcgggg cggggcgagg ggcggggcgg ggcgaggcgg	540
agaggtgcgg cggcagccaa tcagagcggc gcgctccgaa agtttccttt tatggcgagg	600

cggcggcggc ggcggcccta taaaaagcga	660
agcgccgccc gggcggggag tcgctgcac	
gctgccttcg ccccggtcccc cgctccggcc	720
ccgcctcgcg ccgcggccccc cggctctgac	
tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc	780
gggacggccc ttctcctccg ggctgttaatt	
agcgcttggt ttaatgacgg ctgtttctt ttctgtggct	840
gcgtgaaagc cttgaggggc	
tccgggaggg cccttgtgc ggggggagcg	900
gctcgggggg tgctgtgcgtg tgtgtgtgcg	
tggggagcgc cgctgcggc tccgcgctgc	960
ccggcggctg tgagcgcgtc gggcgcggcg	
cggggctttg tgcgtccgc agtgtgcgcg	1020
aggggagcgc ggccgggggc ggtgc(cc)gc	
ggtgcggggg gggctgcgag gggAACAAAG	1080
gctgcgtgcg ggggtgtgc gtgggggggt	
gagcaggggg tgtggcgcg tcggtcggc	1140
tgcaaccccc cctgcacccc cctcccccag	
ttgctgagca cggccggct tcgggtgcgg	1200
ggctccgtac gggcgtggc gcggggctcg	
ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg	1260
gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg	
ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg	1320
gccccccggag cgccggcggc tgtcgaggcg	
cggcgagccg cagccattgc cttttatgtt	1380
aatcggtcga gagggcgcag ggacttcctt	
tgtcccaaat ctgtcgagg ccgaaatctg	1440
ggaggcgccg ccgcaccccc tctagcgccc	
gcggggcgaa gcgggtgcggc gccggcagga	1500
aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt	
cgcccgcccg ccgtccctt ctccctctcc	1560
agcctcgggg ctgtccgcgg gggacggcgt	
gccttcgggg gggacggggc agggcggggt	1620
tcggcttcg gcgtgtgacc ggcggctcta	
gaggctctgc taaccatgtt catgccttct	1680
tcttttcct acagctcctg ggcaacgtgc	
tggttattgt gctgtctcat cattttggca	1740
aagaattcgg cttgatcgaa gcttgcccac	
catg	1744

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer

<400> 6

cagaggcagt acatgctaag aattgagtt

30

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer

<400> 7

agatgctcaa ggggcttcat gatg

24

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer

<400> 8

tattggcgca ctggtcacca

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer

<400> 9

ccaccttctt gatgtcatca

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

正常または梗塞ラット心へのアデノウイルス遺伝子導入によるLacZ発現を示す図である。E. coli β -ガラクトシダーゼ遺伝子を持つアデノウイルスベクター ($1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ opu) を、正常または梗塞後のラット心前壁 (anterior cardiac wall) に注入した。遺伝子投与の5日後にラットを屠殺し、摘出した心臓を組織溶解液中でホモジエナイズした。心ホモジエネートの β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。白いバーは偽手術 (正常) 心、灰色のバーは梗塞心を示す。

【図2】

ラットの偽手術心または梗塞心のLacZ陽性域の分布を示す図である。(A) X-gal染色した心臓の全体図。上段パネル、AxCAZ3 (1×10^{10} opu) を心筋内注入した正常 (偽手術) 心。中段パネル、生理食塩水を注入した梗塞心。下段パネル、AxCAZ3 (1×10^{10} opu) を心筋内注入した梗塞心。左パネル、右室側より観察、中央のパネル、腹側 (正面) より観察、右パネル、左室側より観察。実線の矢印は左冠状動脈 (LAD) の結紮部位を示し、破線の矢印は注入部位を示す。矢尻で囲んだ領域は梗塞域心筋を表す。(B) X-gal染色した心筋梗塞心の横断面。梗塞心を結紮部位と心尖部との中間および下1/4部位で水平に切断した。薄い灰色の領域、

梗塞域、濃い灰色の領域、X-gal陽性心筋。LV、左心室、RV、右心室。

【図3】

偽手術心および梗塞心のアデノウイルスによるAng1の発現を示す図である。遺伝子導入の5日後の正常心および梗塞心において、ヒトAng1特異的mRNAの発現をPCRにより調べた。(A) ヒトAng1特異的発現。レーン1：長さのマーカーとしての100塩基対DNAラダー、レーン2：陽性対照 (AxCAhAng1を感染させたHeLa細胞)、レーン3：正常心、レーン4：AxCAZ3を注入した心臓、レーン5：AxCAhAng1を注入した正常心、レーン6：AxCAhAng1を注入した梗塞心。(B) 内部対照としての対応する細胞・組織のラットGAPDHの発現。長さのマーカーの最も明るいバンドは500塩基対の長さである。

【図4】

梗塞心の様々な領域の毛細血管密度を示す図である。CD34陽性の毛細管密度を各領域で測定した(A、梗塞壁、B、中隔壁、C、梗塞域と隣接する境界領域)。抗CD34モノクローナル抗体で染色された毛細管数をブラインドで計数し、毛細管密度を数/mm²で表した。*: p < 0.01を示す。

【図5】

偽手術心および梗塞心の組織学的所見を示す図である。心筋梗塞の4週間後、心臓を摘出しMasson's trichrome染色 (A～D)、抗CD34モノクローナル抗体による免疫染色 (E～H)、および抗α-SMAモノクローナル抗体による免疫染色 (I～L)を行なった。偽手術心 (A, E, I)、生理食塩水の対照 (B, F, J)、アデノウイルスの対照 (C, G, K)、Ang1処置心 (D, H, L)。バーは50 μmを表す。

【図6】

エコーカルヂオグラフィーによる収縮末期 (end-systole) および拡張末期 (end-diastole) の長軸図を示す図である。心筋梗塞の4週間後、エコーカルヂオグラフィーにより心機能を評価した。2次元エコーカルヂオグラフによる長軸断面が示されている。上パネル、収縮末期の図；下パネル、拡張期の図。矢尻の間の領域は梗塞した前壁を示す。破線で囲んだ領域は左室腔を示す。

【図7】

マウス急性下肢虚血モデルにおけるAng1発現アデノウイルスベクターの単独投

与による壞死抑制効果を示す図である。

【図8】

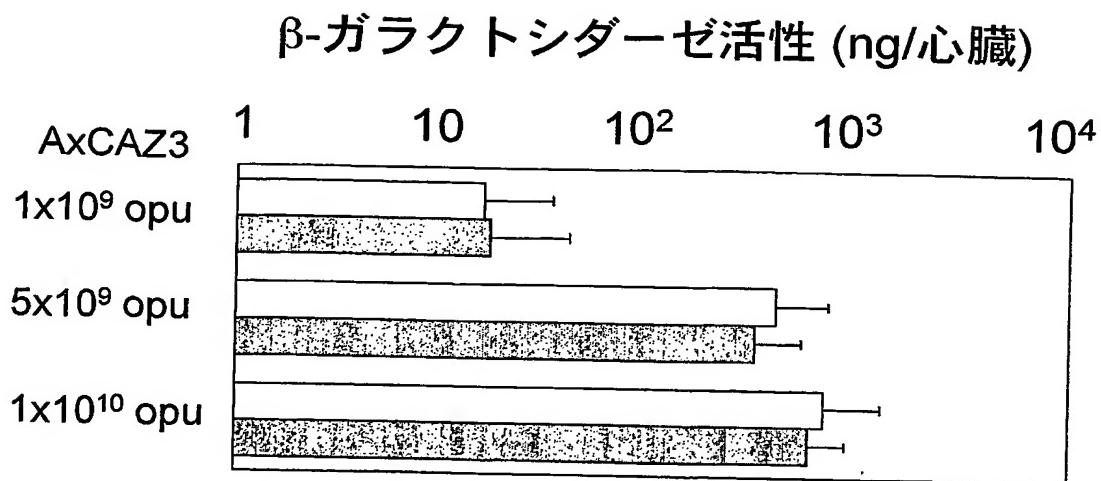
ラット骨格筋（A）および心臓（B）におけるLacZ発現を示す図である。図示した量のプラスミド（ $20\mu\text{g}$ ）を下肢大腿筋または心臓心尖に注入した（n=4）。プラスミド注入の4日後にGalacto-light plus kit を用いて β -gal活性を測定し、筋または心当たりのng活性 LacZとして表した。バーは標準誤差を表す。

【図9】

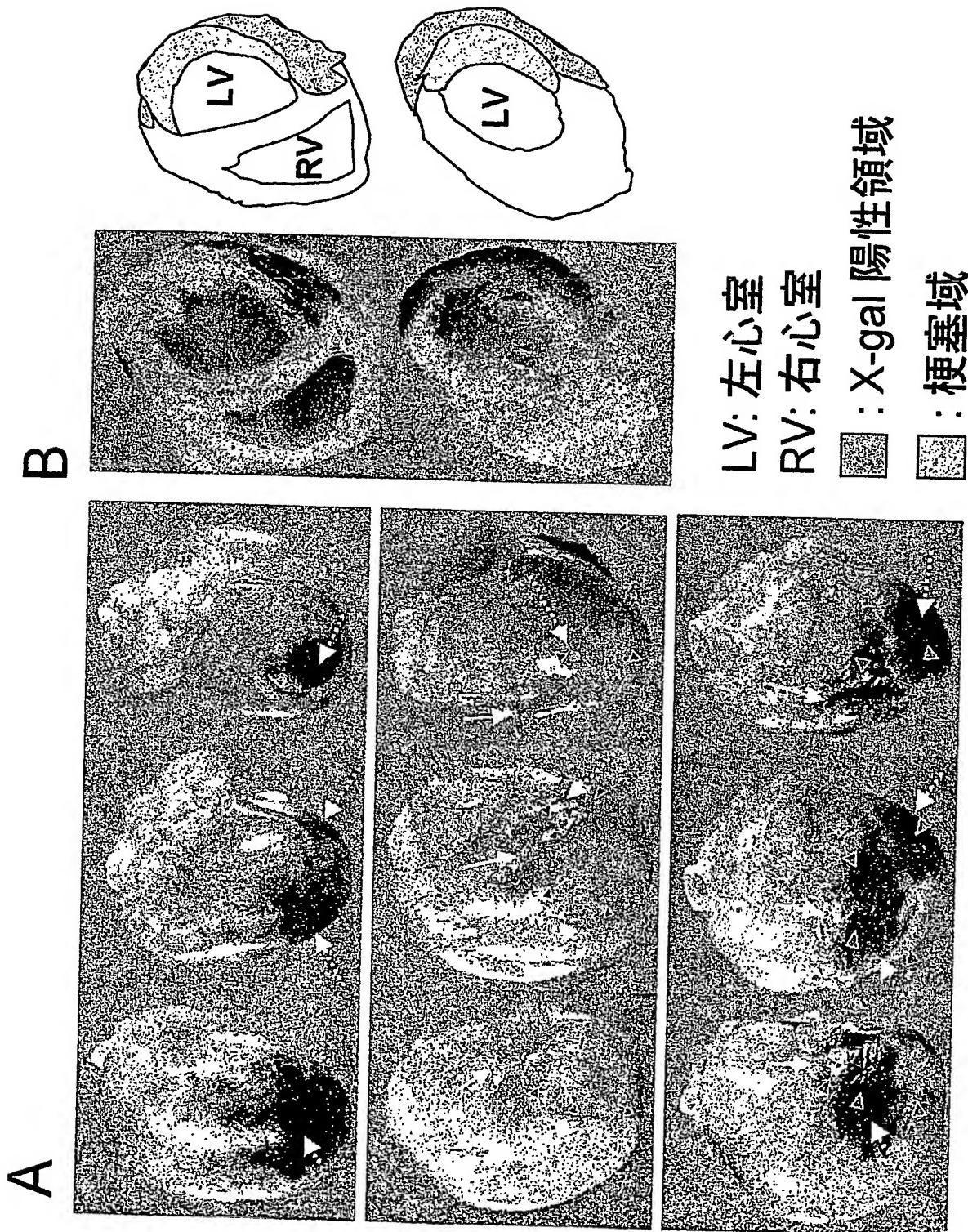
ラット心へのnaked DNA注入とアデノウイルスベクター注入におけるLacZ発現の比較を示す図である。 $20\mu\text{g}$ のpCAZ2または様々な量のAxCAZ3を心筋に注入した。バーは標準誤差を表す（n=4）。

【書類名】 図面

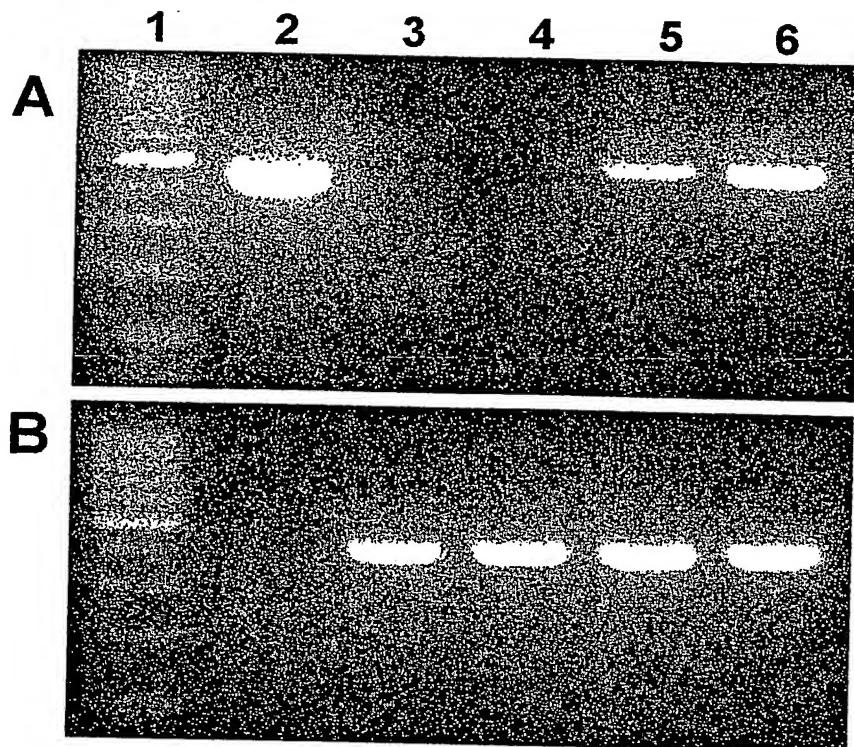
【図1】



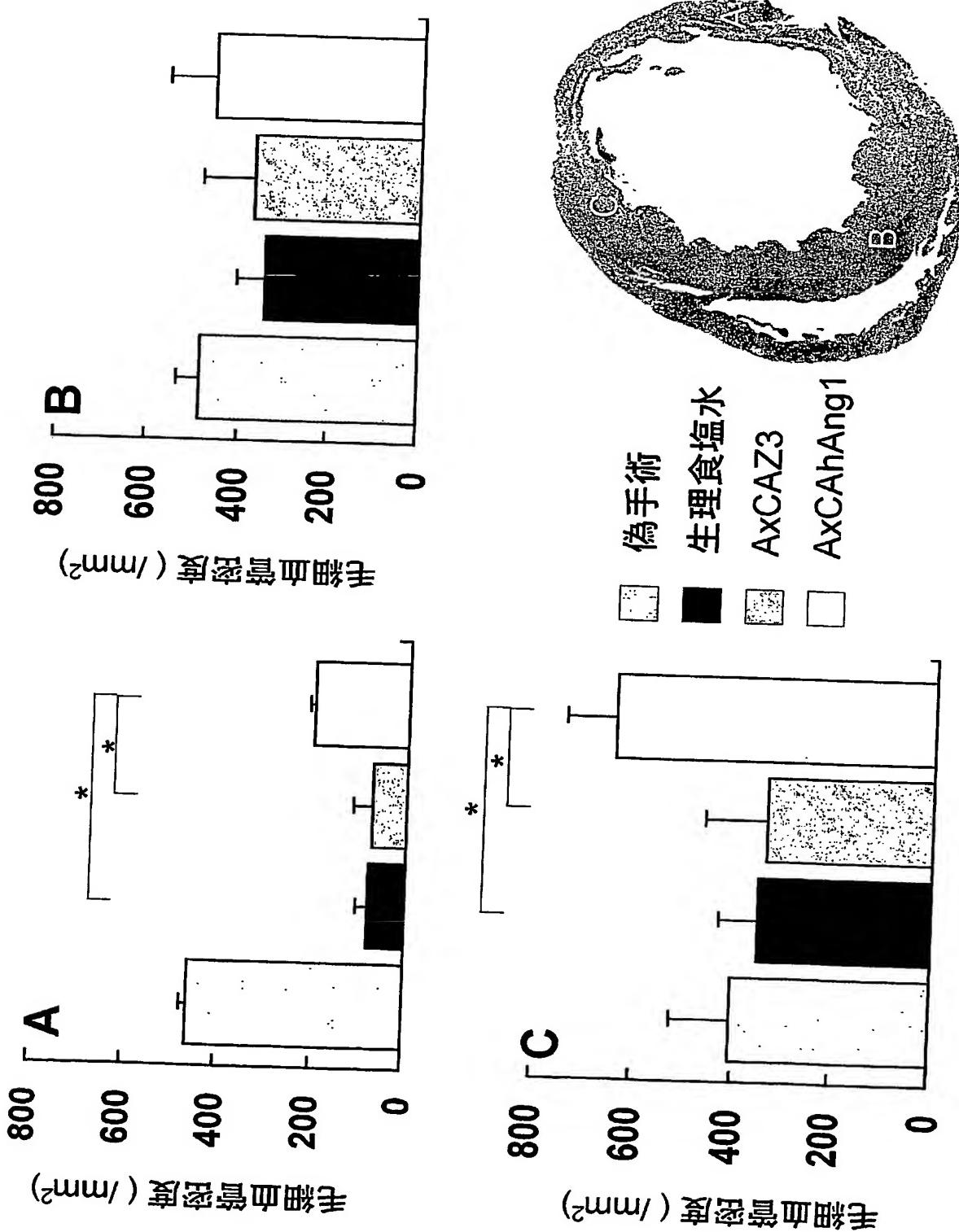
【図2】



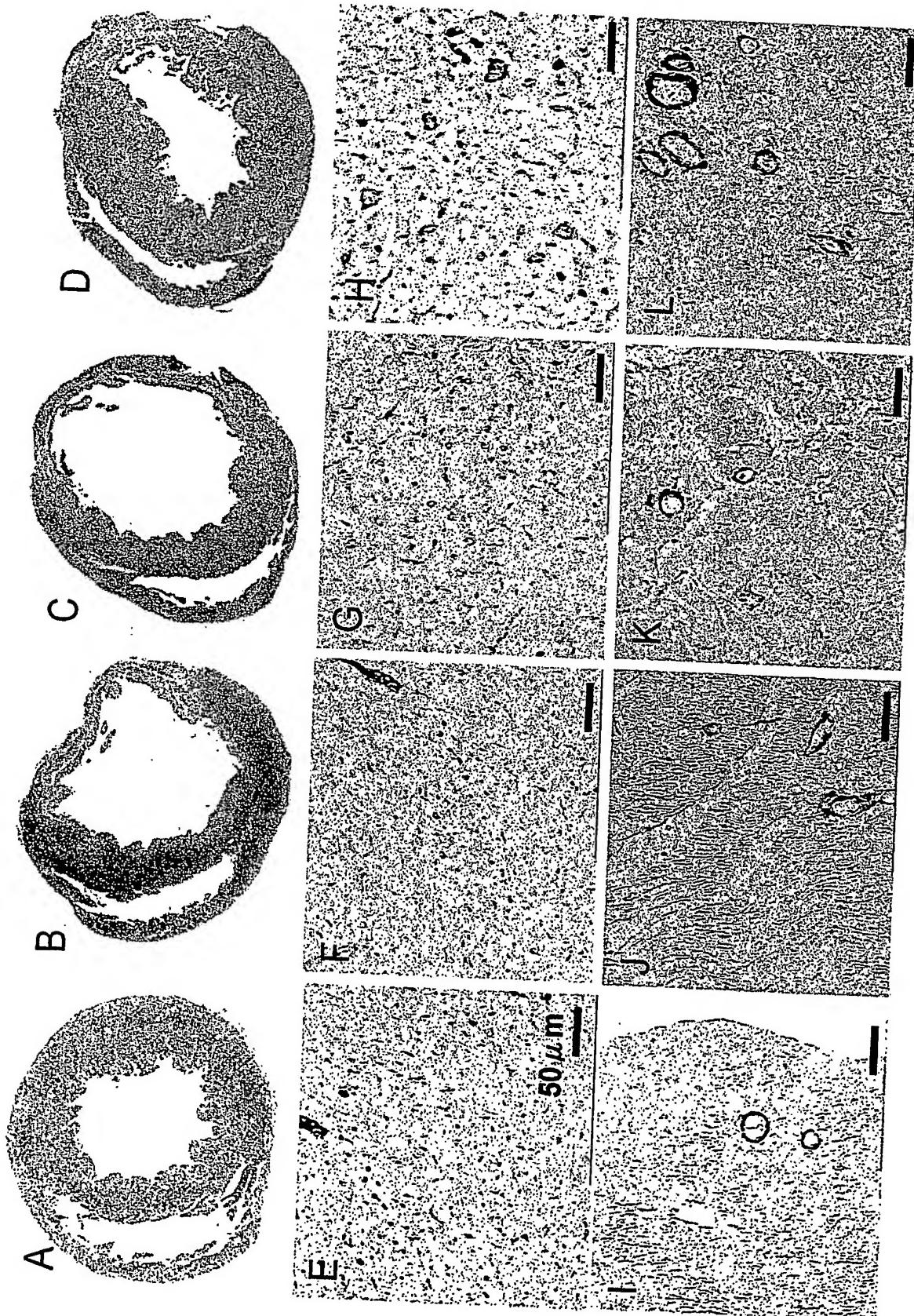
【図3】



【図4】

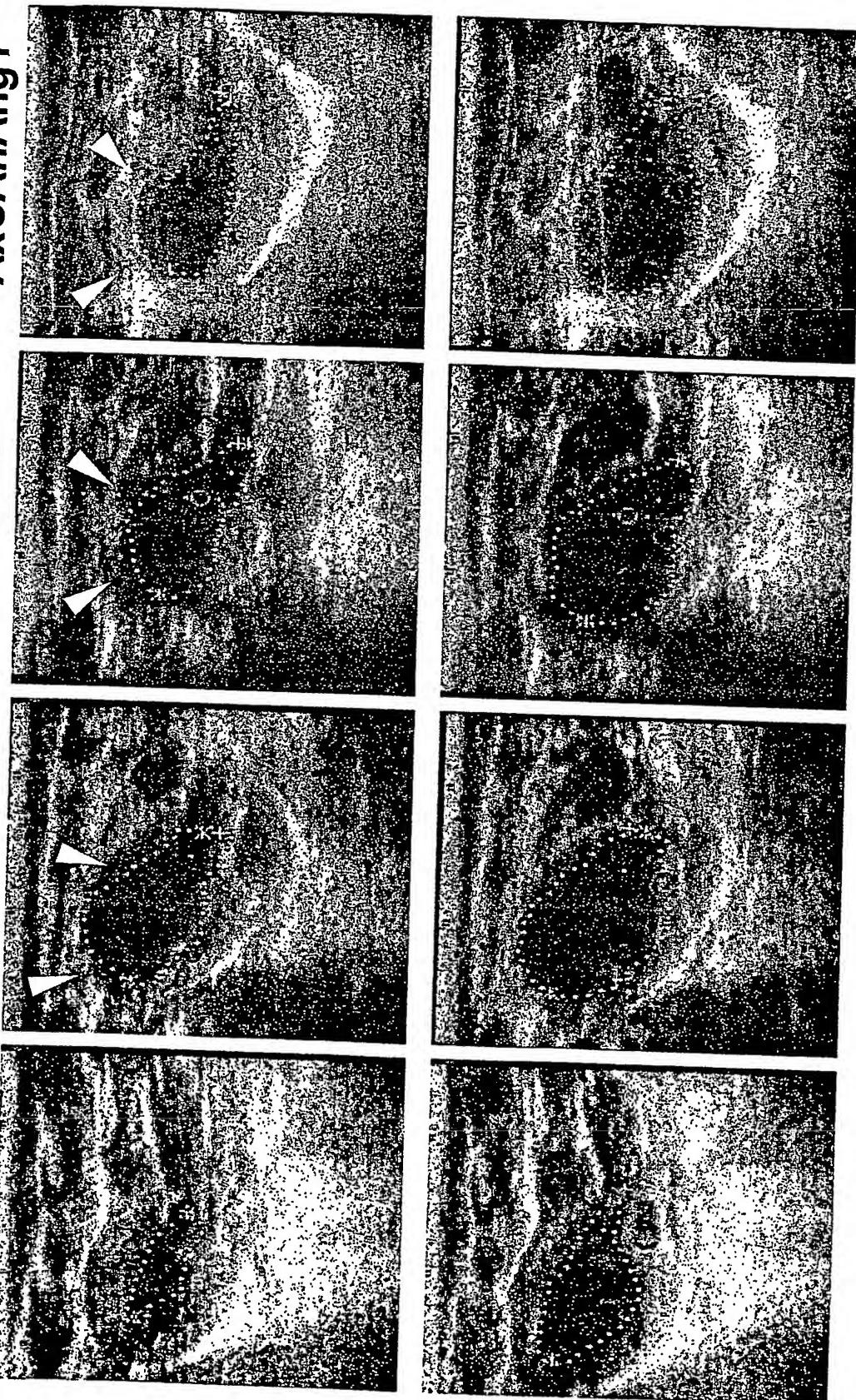


【図 5】



【図6】

偽手術 生理食塩水 AxCAhAng1
AxCAZ3

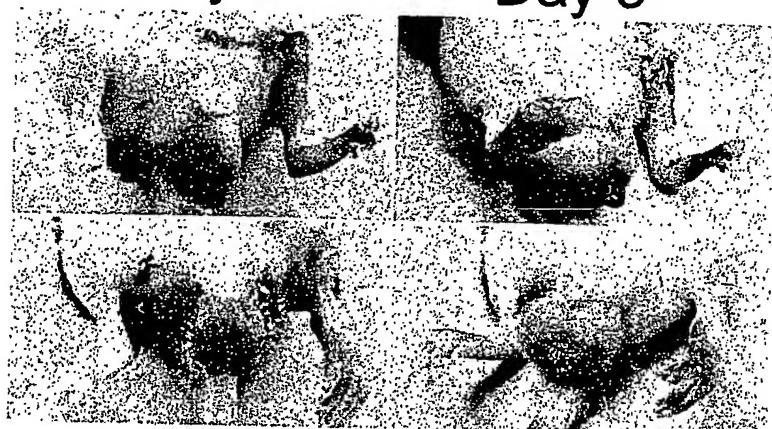


【図7】

対照

Day 3

Day 9

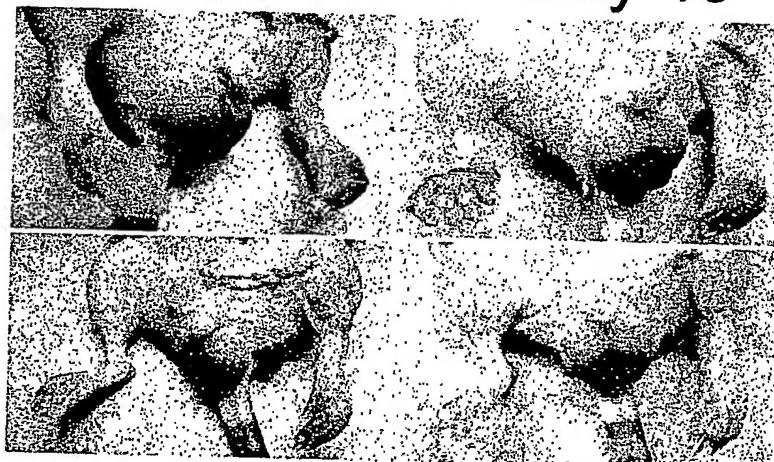


a	b
c	d

AxCAhAng1

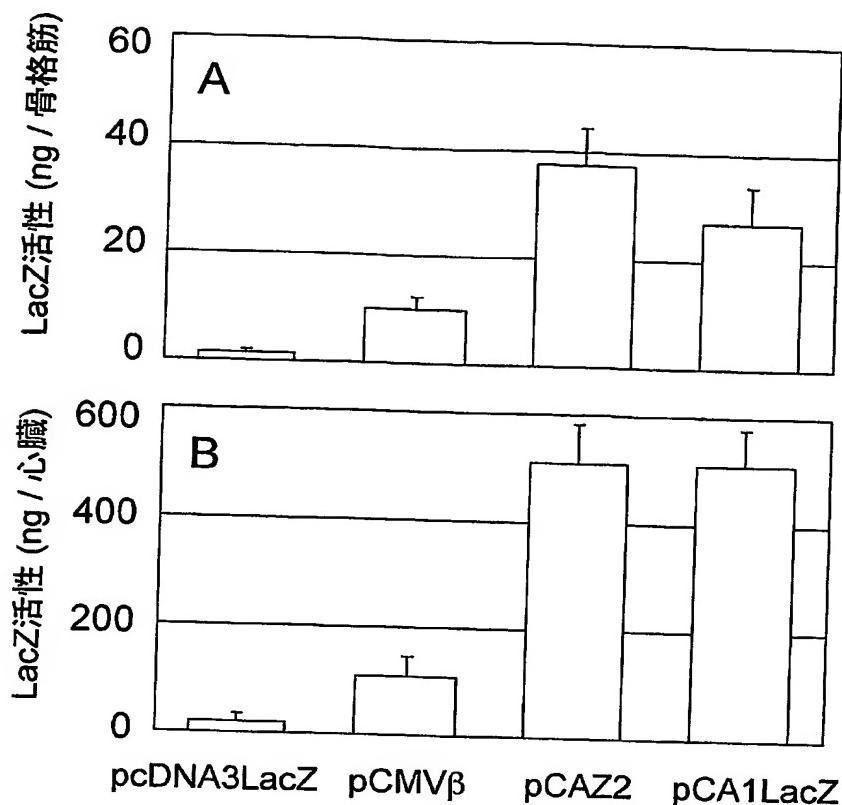
Day 3

Day 10

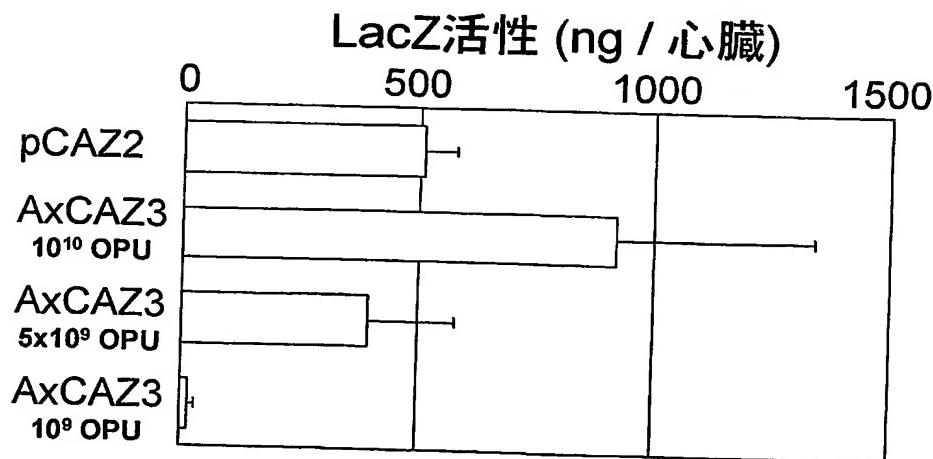


e	f
g	h

【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明はアンギオポエチン-1 (Ang1) またはAng1をコードするベクターを投与する工程を含む、虚血疾患の治療方法を提供する。また本発明は、Ang1を含む虚血疾患治療キットを提供する。

【解決手段】 Ang1を発現するベクターを作製し、ラット心筋梗塞急性期にベクターを心筋内に単独投与してAng1を心筋局所で発現させた。その結果、梗塞後死亡率の低下、心筋での血管数の増加、心筋梗塞巣の縮小、および心機能の改善などの顕著な効果が得られることが判明した。Ang1の血管形成作用に必要なVEGFを投与する必要はなかった。さらに、動脈結紮により誘導したマウス重症虚血肢にAng1発現アデノウイルスベクターを単独投与したところ、顕著な救肢効果が得られることが判明した。Ang1遺伝子治療は、虚血性心疾患および四肢虚血などの虚血疾患に対する安全かつ効果的な治療法として優れている。

【選択図】 なし

特願 2003-040806

ページ： 1/E

出願人履歴情報

識別番号 [595155107]

1. 変更年月日
[変更理由]

1995年11月 1日

新規登録

住所
氏名
茨城県つくば市観音台1丁目25番11号
株式会社ディナベック研究所

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**